



THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA
DAVIS

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Zweite Abteilung. 36. Band

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Zweite Abteilung:

**Allgemeine, landwirtschaftlich-technologische Bakteriologie,
Gärungsphysiologie,
Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz**

In Verbindung mit

Prof. Dr. Adametz in Wien, Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. J. Behrens, Direktor der biologischen Anstalt zu Dahlem-Berlin, Prof. Dr. M. W. Beijerinck in Delft, Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Delbrück in Berlin, Prof. Dr. Lindau in Berlin, Prof. Dr. Lindner in Berlin, Prof. Dr. Löhnis in Leipzig, Prof. Dr. Müller-Thurgau in Wädenswil, Prof. Dr. M. C. Potter, Durham College of Science, New-Castle-upon-Tyne, Prof. Dr. Samuel C. Prescott in Boston, Dr. Erwin F. Smith in Washington, D. C., U. S. A., Prof. Dr. Stutzer in Königsberg i. Pr., Prof. van Laer in Gand, Prof. Dr. C. Wehmer in Hannover, Prof. Dr. Weigmann in Kiel und Prof. Dr. Winogradsky in Petersburg

herausgegeben von

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Oscar Uhlworm
in Berlin

36. Band

Mit 14 Tafeln und 51 Figuren im Texte



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1913

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS

Digitized by Google

Original from
UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Ausgegeben am 14. Dezember 1912.

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Kenntnis obligat anaërober Bakterien.

Von Fritz Bachmann.

Einleitung.

Das Dogma — kein Leben ohne Atmung — erschien vollkommen sicher begründet und erfreute sich allgemeiner Anerkennung, als Pasteur der Nachweis gelang, daß es Organismen gibt, die in allen ihren Funktionen ohne freien Sauerstoff zu existieren vermögen. Diese Angabe ist denn auch lange Zeit bestritten worden. Da Pasteur in seinen Versuchen keine Sauerstoffreagentien verwendete, schien allerdings der Zweifel erlaubt, ob nicht doch in den verwendeten Kulturmedien geringe Mengen Sauerstoff vorhanden gewesen seien, die jedoch keinesfalls ausgereicht hätten, die von Pasteur erhaltenen großen Kohlensäuremengen auf dem Wege normaler Atmung zu bilden. Jeder Zweifel an der Richtigkeit der Pasteurschen Angaben mußte jedoch schwinden, als durch Lachowicz und Nencki¹⁾ einwandfrei festgestellt wurde, daß Bakterien ohne jede Spur chemisch nachweisbaren Sauerstoffs sich zu vermehren vermögen.

Die weiter sich ergebende Frage, ob die Anaëroben dauernd den Sauerstoff entbehren können, ist eingehend erst neuerdings von Kuersteiner²⁾ untersucht worden. Mittels einer sinnreichen Methode wurden bis zu 16 Umimpfungen nacheinander ohne Luftzutritt vorgenommen. Es zeigte sich sowohl bei obligat wie fakultativ Anaëroben keine schädliche Wirkung des Sauerstoffmangels.

Die obligat Anaëroben, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigen wird, zeigen die weitere charakteristische Eigenschaft, daß sie bei vollem Zutritt der Luft, d. h. bei einem Sauerstoffdruck von $\frac{1}{5}$ Atm. in ihrer Vermehrung gehindert, schließlich getötet werden. Die Konzentration des in der Nährlösung gelösten Sauerstoffs ist in diesem Falle weniger als $\frac{1}{1000}$ Gewichtsprozent. Der Sauerstoff ist also für die Anaëroben ein sehr starkes Gift. Doch dürfte auch für die empfindlichsten Arten eine Mindestkonzentration des Sauerstoffs existieren³⁾, unterhalb deren ihre Wachstumstätigkeit nicht mehr gehemmt wird. Nach Versuchen von Beijerinck⁴⁾ und Burri und Kuersteiner⁵⁾ scheint der Sauerstoff in sehr geringer Konzentration auf die Bewegung und die Vermehrung obligat Anaërober sogar förderlich, stimulierend (?) zu wirken. Bei Luftzutritt lassen sich daher auch die obligat Anaëroben züchten⁶⁾, doch nicht, wenn der Nährboden bei einem Luftdruck von 1 Atm. mit Sauerstoff gesättigt ist und bleibt, weil dann die unschädliche Mindestkonzentration schon bei weitem überschritten ist.

¹⁾ Lachowicz u. Nencki, Die Anaërobiosefrage. (Pflügers Arch. f. Phys. Bd. 33. 1884. p. 1.)

²⁾ Kuersteiner, Beiträge zur Untersuchungstechnik obligat anaërober Bakterien usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 19. 1907. p. 204 ff.)

Vgl. Pasteur, Études sur la bière. 1876. p. 291.

Lachowicz u. Nencki, l. c. 1887. p. 8; weitere Angaben über fort-dauernde anaërobe Züchtung obligat anaërober Bakterien sind noch vorhanden, doch wurde in diesen Fällen die Einwirkung der Luft beim Überimpfen nicht vermieden. Die Erfolge Chudjakows (s. Anm. folgender Seite), der Versuche mit Umimpfung ohne Luftzutritt ausgeführt hat, gibt Rotherth nicht an.

³⁾ Chudjakow, Zur Lehre von der Anaërobiose, Ref. von Rotherth. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 4. 1898. p. 389 ff.)

⁴⁾ Les organismes anaërobes ont-ils besoin de l'oxygène libre? (Arch. Néerland. Sér. II. T. 2. 1899. p. 397.)

⁵⁾ Burri u. Kuersteiner, Bedeutung des Sauerstoffentzugs für die Entwicklung obligat anaërober Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. 1908. p. 301.)

⁶⁾ Wuercker, Über Anaërobiose. [Dissert.] Erlangen 1910.

Die fördernde Wirkung des Sauerstoffs ist der exakten experimentellen Forschung, wenigstens auf den bisher begangenen Wegen, kaum zugänglich. Die Giftwirkung dagegen ist bei den obligat Anaëroben verglichen mit der bei Aëroben besonders leicht zu studieren, da der Sauerstoff eben schon in einer Konzentration giftig wirkt, die uns in unserer Atmosphäre stets zur Verfügung steht. Trotzdem ist auch hierüber noch keine eingehendere experimentelle Studie vorhanden und wir stehen im Grunde genommen noch auf demselben Standpunkt wie Pasteur, der die Giftwirkung des Sauerstoffs der Luft bei den obligat Anaëroben zwar konstatierte, aber nicht näher untersuchte. So z. B. ist die Zeit, innerhalb welcher der Sauerstoff der Luft tödlich wirkt, noch nicht genauer untersucht.

Der erste Versuch zur Beantwortung dieser Frage wurde zwar schon von Pasteur mit dem „vibron butyrique“ ausgeführt¹⁾. Pasteur leitete durch einen in Gärung begriffenen Kolben Luft, nach $\frac{1}{2}$ Stunde waren Bewegung und Gärung erloschen und kehrten auch nicht zurück, wenn nun ein Kohlensäurestrom durch die Gärflüssigkeit geschickt wurde. Ein Vergleichskolben, durch den dauernd Kohlensäure geleitet wurde, zeigte nach drei Stunden gute Beweglichkeit. Als Zeichen für den Eintritt des Todes wird also hier der Verlust der Gärfähigkeit angesehen, in diesem speziellen Falle vermutlich mit Recht.

Im Jahre 1889 gibt Luederitz²⁾ einen Versuch mit *Bacillus liquefaciens magnus* an, der insofern einen Fortschritt bedeutet, als der Eintritt des Todes nach dem Verlust des Vermögens, Kolonien zu bilden, d. h. der Vermehrungsfähigkeit beurteilt wird. Luederitz verarbeitet mehrere Ösen sporenfreien Materials mit Gelatine zu Esmarchschen Rollröhrchen, nachdem vorher aus der beimpften Gelatine eine Öse voll in hoher Gelatine verteilt war (Kontrollkulturen kürzester Lufteinwirkung). Solcher Röhrchen wurde eine ganze Reihe angesetzt. Die Gelatine wurde nach Lufteinwirkung wieder verflüssigt und davon zur Prüfung der nunmehrigen Lebensfähigkeit je eine Öse voll in hoher Traubenzucker-Gelatine verteilt. In den Kontrollkulturen traten zahllose Kolonien auf. In den Versuchskulturen waren schon nach weniger als 2 Stunden weitaus die meisten Keime getötet: nach 2 Stunden entstanden 6 bzw. 8 Kolonien, nach 4 Stunden 0 Kolonien, nach 8 Stunden 1 und 0 Kolonien, bei längerer Zeit trat kein Wachstum ein.

Die Versuche Chudjakow³⁾ bringen keinen prinzipiellen Fortschritt, doch ist die Methode exakter: Es wurden Gelatineplattenkulturen mit einer abgemessenen Menge einer jungen, keine Sporen enthaltenden Kultur infiziert. Diese blieben eine Anzahl von Stunden an der Luft oder wurden von Anfang an im Vakuum gehalten: 1stündige Einwirkung der Luft war ohne merklichen Einfluß, 4stündige sehr merklich, 15stündige vernichtete alle vegetativen Stadien.

In der Literatur sind noch einige Angaben über Sauerstoffresistenz der Anaëroben verstreut zu finden. Die Versuchsanordnung ist jedoch in diesen Fällen nicht näher angegeben oder wenig einwandfrei, so daß ich die Mitteilung der Resultate füglich unterlassen kann.

Die Unvollständigkeit der bisherigen Erfahrungen über die Sauerstoffresistenz ließ es wünschenswert erscheinen, die Frage in einer besonderen Untersuchung wieder aufzunehmen. Ich suchte also festzustellen, wie lange mindestens die atmosphärische Luft einwirken muß, damit die verschiedenen Entwicklungsstadien, speziell junge vegetative Zustände und Sporen obligat anaërober Bakterien die Fähigkeit verlieren, Kolonien zu bilden. Die Wirkung einer geringeren tödlichen Sauerstoffkonzentration, als sie unter Luft von Atmosphärendruck vorhanden ist, wurde nur bei Sporen untersucht. Für die Vegetativen ergab sich im Laufe der Untersuchungen noch die Frage, nach welcher Zeit die Beweglichkeit an Luft und — nach vorübergehender Lufteinwirkung — im Vakuum erlösche. Es wurde besonders

¹⁾ Pasteur, *Études sur la bière*. 1876. p. 292. Ein ähnlicher Versuch ist schon in der ersten Arbeit beschrieben (*Animalcules infusoires viv. sans gaz-oxygène libre et déterminant des fermentations*. (Compt. rend. T. 52. 1861. p. 346); als Tötungszeit sind 1—2 Stunden angegeben.

²⁾ Luederitz, Zur Kenntnis der anaëroben Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 5. 1889. p. 158.)

³⁾ Chudjakow, l. c. 1898. p. 391.

Wert gelegt auf eingehende Kritik der Versuchsmethoden und kritische Beurteilung der Resultate.

Für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit bin ich Herrn Geheimen Rat Pfeffer zu großem Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil.

I. Material.

In der Hauptsache arbeitete ich mit drei streng anaëroben Arten: *Bacillus amylobacter* A. M. et Bredem., *Bacillus botulinus* van Ermeng., *Paraplectrum foetidum* Weigm. — mit *Bacillus Chauveaui* habe ich nur vereinzelte Versuche angestellt, die ich nicht bis zu einem endgültigen Resultate fortführte.

1. *Bacillus amylobacter* A. M. et Br. wurde nach der Vorschrift Bredemanns¹⁾ aus dem Erdboden isoliert. Reagenzröhrchen wurden etwa 6 cm hoch mit sterilisierter N-freier Nährlösung (Winogradsky) gefüllt, dazu wenig frische Erde aus dem botanischen Garten und etwas Schlämmkreide gegeben. Darauf wurden sie wenige Minuten in siedend heißes, jedoch nicht weiter erhitztes Wasser gestellt. Bei 28° C trat dann im Laufe von 1—2 Tagen starke Gärung und typischer Buttersäuregeruch auf. — Nach 8 Tagen wurden von diesem Rohmaterial, nachdem es zur Auslese der widerstandsfähigeren Sporen mit heißem Wasser verdünnt worden war, Oberflächenkulturen auf Platten angelegt und durch wiederholte Umimpfung Reinkulturen erhalten.

Die Kolonien sind schmutzig weiß, auf der Oberfläche des Agars²⁾ kreisrund und erhaben, in der Tiefe linsenförmig, glatt begrenzt, bei dünner Aussaat bis zu 4 mm im Durchmesser, meist 1½ bis 2 mm, zumeist am dritten Tage makroskopisch wahrnehmbar (bei 28—30° C).

In tiefem Agarstich tritt ohne Entfernung des Sauerstoffes gewöhnlich kein Wachstum ein. Die Gasbildung ist sehr energisch, so daß der Agar durch Gasblasen vollkommen zerklüftet und in die Höhe getrieben wird.

In Pepton-Fleischextrakt-Gelatine (anaërob) ist das Wachstum sehr spärlich. Der Zusatz von Traubenzucker ist notwendig. Inwieweit dieser durch verwandte Stoffe vertreten werden kann, habe ich nicht untersucht. Die Gelatine wird selbst nach Wochen nicht verflüssigt (25° C).

In Traubenzucker-Bouillon erfolgt bei 31° C rasches und gutes Wachstum. Nach 12—16 Stunden ist zuweilen schon schwache Trübung zu bemerken, im Verlauf von weiteren 4—8 Stunden tritt starke Trübung und kolossale Gasbildung ein. Nach drei Tagen ist die Gärung gewöhnlich beendet und es bildet sich ein grauweißer Bodensatz.

Die Sporenbildung geht am besten auf Traubenzucker-Agar vor sich. In Bouillon werden reife Sporen in geringerer Menge gebildet, sehr viele bleiben auf einem früheren Bildungsstadium stehen. Die Stäbchen werden bei der Sporenbildung ziemlich gleichmäßig dicker, am meisten in der Mitte, am wenigsten an den abgerundeten Enden. Keulen und Rhomboid-Formen sind selten. Die Sporen sind fast endständig. Granulose wird reichlich abgelagert, wie das schon vielfach beschrieben wurde.

¹⁾ Bredemann, *Bacillus amylobacter* A. M. et Br. usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 392.)

²⁾ Oberflächenkolonien wurden stets nur bei Abwesenheit von Sauerstoff erhalten; das gilt natürlich auch für die anderen streng anaëroben Arten.

Die Jugendformen haben durchschnittlich folgende Dimensionen. Länge: 4,2, Breite: 1,1 μ . Die Sporenträger sind 5 μ lang und in der Mitte 1,3 μ dick; die Sporen 1,9 μ lang, 1,23 μ dick.

2. *Paraplectrum foetidum* Weigmann. Ich habe mir eine Kultur dieses Bacillus von Kräl verschafft und werde ihn unter dieser Bezeichnung auch anführen, obwohl von Barthel¹⁾ seine Identität mit dem *Bacillus putrificus* Bienst. nachdrücklich betont worden ist. Ich kann nach meinen rein physiologisch gerichteten Untersuchungen die Richtigkeit dieser Angabe weder bestätigen, noch bestreiten. Weigmann hat sich, so viel ich weiß, noch nicht dazu geäußert.

Die Charakteristik meines Stammes stimmt mit der des *Paraplectrum foetidum* Weigmanns²⁾ im wesentlichen überein.

In Traubenzucker-Agar fand ich die Kolonien stets rundlich, mit Buckeln und ziemlich dicken, bei 60-facher Vergrößerung dickfädigen Ausläufern versehen.

Auf Agar gehen von einem rundlichen bräunlichen Kern weißliche, wenig dichte, ziemlich breite Ausläufer aus, die sich dendritisch verzweigen. Die Begrenzung am Ende der Ausläufer ist rund und scharf.

Die Gasbildung ist sehr gering. Weigmann gibt dagegen für sein *Paraplectrum foetidum* starke Gasbildung an (die Kultur in toto betrachtet), erwähnt aber für Traubenzucker-Agar zwei Typen von Kolonien, rundliche verfilzte und linsenförmige, während ich die letzteren fast nie erhalten habe. Es ist wohl möglich, daß die Form der Kolonien von der Intensität der Gasbildung abhängig ist, daß bei starker Gasproduktion durch Entstehen kleiner Spalten die Bildung linsenförmiger Kolonien begünstigt wird. Die Gasbildung ist also möglicherweise eine variable Eigenschaft des *Paraplectrum foetidum* und Weigmann hat zwei Rassen vor sich gehabt, die eine stark, die andere schwach gasbildend.

In tiefem Agarstich erfolgt bei Luftzutritt gutes Wachstum bei 31° in 24 Stunden 1 cm unter der Oberfläche. Nach 2—3 Tagen bis zur Oberfläche vordringend.

In Gelatine-Stichkultur (anaërob) entstehen nach 4—5 Tagen gute Kolonien, dann erfolgt Erweichung, schließlich nach etwa 8 Tagen völlige Verflüssigung. Der Geruch ist unangenehm nach überreifem Käse. Das Wachstum ist mit und ohne Traubenzucker gleich kräftig.

Die Länge der Stäbchen beträgt durchschnittlich 3,3 μ . Die Sporenträger sind 2,4 bis 5,7 μ , im Durchschnitt 3,5 μ lang, 0,8 bis 1,2 μ dick. Durchschnittlich sind die jungen Stäbchen etwas dicker als ältere. Erst bei der Sporenbildung schwellen diese an einem Ende an. Die Anschwellung geht allmählich in den normalen Bakterienkörper über, so daß eine keulenartige, nicht stecknadelartige Gestalt resultiert. Die Sporen sind oval, 1,23 μ lang, 0,95 μ dick.

Die Sporenbildung geht am besten in Nährgelatine mit oder ohne Traubenzucker vor sich.

Jod färbt die Kolonien rötlich; unter dem Mikroskop ist an den einzelnen Stäbchen keine Färbung zu bemerken.

3. *Bacillus botulinus* van Ermeng. Ich erhielt eine Kultur aus dem hiesigen hygienischen Institut durch gütige Vermittlung des Herrn

¹⁾ Barthel, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 18.

²⁾ Weigmann, Über zwei an der Käse- und Käsereifung beteiligte Bakterienarten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. p. 827.)

Dr. Schmidt. Sie stammte von einem Berliner Fall von Botulismus. Die Stoffwechselprodukte des Bacillus hatten nach Angabe des Herrn Dr. Schmidt ihre toxische Wirkung verloren.

Der Bacillus ähnelt in allem sehr dem *Paraplectrum foetidum*. In Traubenzucker-Agar sind seine Kolonien gelblich, rund, mit sehr zahlreichen fädigen Emergenzen. Auf Agar werden ebenfalls Ausläufer gebildet, doch wachsen an ihren Enden einzelne Bakterienfäden weiter, so daß die glatte Begrenzung verloren geht. Er wächst im Gegensatz zum *Paraplectrum foetidum* auch von der Oberfläche aus in den Agar hinein, so daß das Abimpfen erschwert wird. Im Agarstich fallen ebenfalls die sehr zahlreichen Ausläufer auf.

In Nährgelatine sind die Verhältnisse fast gleich denen bei *Paraplectrum*. Die Gelatine wird verflüssigt, Vorhandensein von Traubenzucker ist unnötig.

In Bouillon ist der Niederschlag flockiger und fester als bei *Paraplectrum foetidum*.

Die Gasbildung ist stets gering, während sie van Ermengem¹⁾ als kolossale beschreibt. Ob hier der Verlust einer nur scheinbar charakteristischen Eigenschaft vorliegt, ist nicht zu entscheiden. Der Verlust der Toxizität bedeutet jedenfalls ebenso wie der der Gasbildung eine Änderung des Chemismus des Bacillus; es wäre ja möglich, daß beide Hand in Hand gehen.

Die jungen Stäbchen sind 2,6 bis 6,4 μ , im Mittel 3,6 μ lang, 0,8 μ dick. Die Sporenträger sind 4,0 bis 5,6 μ , im Mittel 4,5 μ lang, 0,6 bis 0,7 μ dick. Die Sporenbildung ist ganz wie bei *Paraplectrum foetidum* und geht auch in Gelatine besonders gut vor sich. Die Sporen sind 1,6 bis 1,8 μ lang und 1,2 bis 1,5 μ dick.

II. Methodik.

Von vornherein mußte ich zu einer Methode greifen, die es ermöglicht, aus meinen Versuchskulturen den Sauerstoff nach dessen Einwirkung in kurzer und bestimmbarer Zeit wieder zu entfernen. Ich arbeitete nach einem im hiesigen Institut schon seit Jahren gebräuchlichen kombinierten Verfahren, das im Prinzip schon von Wieler²⁾ angegeben wurde.

Die Petrischalen oder sonstigen Kulturgefäße brachte ich unter Glocken, die bei meinen Versuche stets dreimal evakuiert und mit Wasserstoff gefüllt wurden. Mit ihrem breiten gutgeschliffenen Rande wurden sie auf plangeschliffene Glasplatten aufgesetzt (mittels einer Mischung von 50 Teilen Kolophonium, 20 Japanwachs, 30 Vaseline, die auch bei 35° genügend fest bleibt, daher beim Zusammensetzen der Glocke erwärmt werden muß.) In den Tubus der Glocke wurde ein Glashahn mittels eines Kautschukstopfens sehr fest eingefügt. Die Glocke konnte durch einen Dreiweghahn sowohl mit der Wasserstrahl-Luftpumpe als mit dem Wasserstoffapparat verbunden werden. Der Wasserstoff wurde aus arsenfreiem Zink (Prüfung nach Marsh) und Schwefelsäure in einem nach Doebererschem Prinzip gebauten Apparat entwickelt, das Eindringen freien Sauerstoffes

¹⁾ van Ermengem, Über einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 26. 1897. p. 40 ff.)

²⁾ Wieler, Die Beeinflussung des Wachstums durch verminderte Partiär-
pression des Sauerstoffs. (Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen. Heft 2. 1883. p. 194.)
Vgl. die Figur bei Pfeffer, Physiologie. II. Aufl. Bd. 1. p. 542.

von der an Luft grenzenden Oberfläche der Säurelösung durch Zugabe von 1 Proz. Ferrosulfat verhindert. Zur Reinigung wurde der Wasserstoff durch U-Röhren geleitet, die mit Kalilauge bzw. Kaliumpermanganat getränkten Bimsstein enthielten. Zwischen die Glocke und den Dreiweghahn war mit Hilfe eines T-Rohres ein Quecksilbermanometer eingeschaltet, das Eindringen von Quecksilberdampf in die Leitung wurde durch eine dünne Wasserschicht im Manometerrohr verhindert. — Die Kautschukverbindungen wurden, soweit möglich, unter Wasser gesetzt und sonst auf ein Minimum reduziert, indem auf weiteren Strecken Bleirohr benutzt wurde, dessen Enden mit Siegelack in Glasröhren eingekittet, durch Kautschuksaugschlauch praktisch vollkommen luftdicht zu verbinden waren.

Regelmäßig wurde der Apparat auf dichten Schluß geprüft, indem eine größere Glocke angeschlossen, ausgepumpt und dann verbunden wurde mit der Leitung zum Wasserstoffapparat, dessen Hahn selbstverständlich geschlossen war. Durch Wiederholen des Pumpens wurde auf wenige Zentimeter evakuiert. Das Manometer sank die folgende Stunde noch ziemlich beträchtlich, da der Bimsstein das in ihm eingeschlossene Gas nur langsam abgibt. In den nächsten 20 Stunden wurde meist noch ein Sinken von 2—3 mm notiert, was auf eine auch bei peinlichster Behandlung nicht vermeidliche Undichtigkeit im Hahn des Wasserstoffapparates (Schlifffehler im zentralen Teil) zurückzuführen war. Doch war das für meine Versuche ohne Belang, da ich stets die Leitung vom Wasserstoffapparat bis zum Dreiweghahn offen hielt.

Die letzten Reste des besonders aus den Kulturmedien noch entweichenden Sauerstoffs wurden durch Kalilauge und Pyrogallol entfernt, die durch eine Paraffinleiste getrennt in einer Schale unter die Glocke gebracht und erst nach dem Evakuieren vereinigt wurden. Indes bildet sich bei ruhigem Stehen an der Oberfläche leicht eine Haut von verharztem Pyrogallol, die dessen weitere Wirksamkeit hindert. Ich habe daher später außerdem unter jede Glocke eine Petrischale gebracht mit der Kultur eines fakultativ anaëroben Bacillus, der bei Luftzutritt besser gedeiht, daher den Sauerstoff begierig absorbiert. Die fertigen Glocken wurden stets bis über die gekittete Stelle unter Wasser gesetzt.

Die von mir benutzte Wasserstrahlpumpe saugte bei einem Wasserverbrauch von ca. 0,6 cbm pro Stunde eine Glocke von 1,5 l Inhalt in 6 Minuten bis auf 3,5 mm = $1/215$ Atmosphäre ab. Bei dreimaligem Evakuieren mußte also auch der empfindlichste Anaërobe Wachstumsbedingungen finden. Ich habe die Wasserstrahlpumpe verwendet trotz den Einwänden N a b o k i c h s¹⁾ gerade gegen dieses Instrument der W i e l e r s c h e n Methode. Es ist ja zweifellos, daß ein Rückdiffundieren des Sauerstoffs aus dem Wasser der Luftpumpe erfolgen kann, wenn die Pumpung zu lange ausgedehnt wird. Ein Rückströmen von Sauerstoff kann bei unregelmäßigem Arbeiten der Pumpe vorkommen, auch wenn durch ein Rückflußventil das Zurückströmen des Wassers verhindert wird. Zuletzt arbeitet die Pumpe stets ruckweise, aber ich habe am Manometer nie ein Zurücksinken des Quecksilbers beobachtet, wenn man nicht Oszillationen um die Ruhelage, die bei ruckweisem Pumpen selbstverständlich sind, dahin deuten will.

In dieser Form ist die angegebene Methode sehr brauchbar und relativ

¹⁾ N a b o k i c h , Temporäre Anaërobiose höherer Pflanzen. (Landwirtsch. Jahrb. 38. 1909. p. 71.)

bequem. Statt der Glocken Exsikkatoren zu verwenden, wird in manchen Fällen vorteilhaft sein¹⁾. (A. Meyer.)

Zum Umimpfen von Reinkulturen in Reagensgläsern mit Bouillon oder festen Nährböden habe ich mich mit ausgezeichnetem Erfolge der bekannten von Burri verbesserten Wrightschen Methode bedient, bei der über den sterilen Wattestopfen in geringer Entfernung ein zweiter nicht steriler geschoben wird, der zur Aufnahme von je 1 ccm 20-proz. Kalilauge und Pyrogallollösung dient. Es ist empfehlenswert, in den oberen Wattlebausch seitlich eine Rinne einzudrücken, vor Zugabe der Lösungen, damit diese beim Verschuß durch den Kautschukstopfen nicht zum sterilen Wattlebausch durchgepreßt werden.

Die Nährböden verwendete ich in folgender Zusammensetzung:

1. Agar 1,6 Proz., Traubenzucker 1 Proz., Pepton (Witte) 1,2 Proz., Fleischextrakt 0,8 Proz., NaCl 0,2 Proz.

2. Bouillon je 0,5 Proz. Traubenzucker, Pepton, Fleischextrakt; 0,04 Proz. Indigkarmin.

3. Gelatine 16 Proz., sonst wie bei Agar.

Die Nährböden wurden mit Na_2CO_3 schwach alkalisch gemacht.

Ich gehe nun zur Beschreibung und Kritik der speziellen Anordnung der Mehrzahl meiner Versuche über. Besondere Methoden, die bei Umimpfung ohne Luftzutritt und bei der Beobachtung der Beweglichkeit zur Anwendung kamen, werden eingangs der entsprechenden Kapitel beschrieben werden.

Meine Untersuchungen verfolgten das Ziel, das Verhalten verschiedener Entwicklungsstadien der Anaëroben zum Sauerstoff der Luft getrennt zu bestimmen. Im wesentlichen mußte es sich darum handeln, die beiden Extreme der Entwicklungsreihe, Sporen und junge vegetative Stadien zu untersuchen, da von vornherein zu vermuten war, daß diese zwei Extreme durch Zwischenglieder von kontinuierlich sich ändernden intermediären Eigenschaften verbunden sein würden.

Die erste Forderung war also, mir möglichst rein vegetatives und möglichst reines Sporenmaterial zu verschaffen. Oberflächenkulturen auf Agarplatten²⁾ bieten hierbei manchen Vorteil, ihre Herstellung ist jedoch zeitraubend, auch stellten sich der Abimpfung und gleichmäßigen Verteilung der Keime Schwierigkeiten entgegen. Ich habe daher später nur noch Bouillonkulturen als Vorkulturen benutzt, die ich in Reagensröhrchen unter Wright-Burri-Verschuß ansetzte. Diese hatten allerdings ihrerseits den Nachteil, daß ich sie reichlich mit Sporen impfen mußte, wenn ich rasch kräftiges Wachstum erhalten wollte. Ich mußte gewärtig sein, daß am ersten Tage nach der Impfung noch nicht alle Sporen gekeimt seien, während im Laufe des zweiten Tages die Sporenbildung oft schon wieder einsetzte. Um die so entstehende Unsicherheit in der Beurteilung meines Materials zu beseitigen, habe ich die verschieden große Hitzeresistenz der Vegetativen und Sporen als Unterscheidungsmerkmal benutzt (s. p. 10). Selbstverständlich mußten hierbei die morphologischen und physiologischen Untersuchungen Hand in Hand gehen und einander ergänzen.

Die ersten Versuche stellte ich mit Oberflächenkulturen an, indem ich

¹⁾ Meyer, A., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. 1906. p. 337.

²⁾ Dieser Ausdruck wird der Kürze halber angewendet, obwohl ich nur mit Petrischalen, nicht mit Glasplatten arbeitete.

eine Anzahl kräftig getrocknete, also von Kondenswasser freie Agarplatten mit einer bestimmten geringen Menge einer Bakterienaufschwemmung übergoß, bestimmte Zeit stehen ließ und dann die überstehende Flüssigkeit abschüttete. Zur Aufschwemmung verwendete ich anfangs sterilisiertes Leitungswasser, später sterilisierte Bouillon. Obwohl auf diese Weise die Wirkung des Sauerstoffs am unabhängigsten von anderweiten schädigenden Einflüssen studiert werden könnte, bin ich bald von der Verwendung von Oberflächenkulturen abgekommen, da mir die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Keime nicht befriedigend erschien. Außerdem durfte die Zahl der geimpften Keime nur gering sein, da sonst das Zusammenlaufen der Kolonien die Zählung erschwerte.

Ich ging dazu über, nach der Koch'schen Methode die Keime im flüssigen Agar zu verteilen und mit ihm Platten zu gießen. Ich habe nur in seltenen Fällen von Bouillonkulturen in den Agar direkt geimpft, dagegen fast stets das Material in steriler Bouillon verdünnt. Das hatte, abgesehen von der Vermeidung zu starker Impfung, den Zweck, die Verteilung der Keime im Agar gleichmäßiger zu bekommen. Statt mit einigen Ösen unverdünnten konnte ich mit etwa 2—3 ccm verdünnten Materials den Agar versetzen. Daß hierbei die Mischung wirklich eine schnelle und vollständige ist, konnte ich in den Fällen verfolgen, in denen ich Indigkarmin-Bouillon zu den Vorkulturen oder zur Verdünnung verwendete. Der Agar färbte sich bei mäßigem Schütteln schon nach wenigen Sekunden homogen grünlich. Die Mischung wurde in Erlenmeyer-Kölbchen vorgenommen, die nur zu etwa $\frac{1}{3}$ mit Agar gefüllt waren, so daß ein kräftiges Schütteln möglich war. Es wurden dann mit einer am oberen Ende mit einem Wattestopfen verschlossenen sterilen Pipette gleiche Mengen Agars auf Petrischalen (meist drei) verteilt. Das Kölbchen mit dem Rest des Agars wurde in siedendem Wasser $1\frac{3}{4}$ bis $2\frac{1}{4}$ Minuten geschwenkt und mit diesem erhitzten Material (s. p. 7 u. 10) wurden mit einer zweiten sterilen Pipette Platten mit gleicher Quantität Agars gegossen. Zu Petrischalen von $7\frac{1}{2}$ cm Durchmesser nahm ich 7 ccm Agar, so daß eine durchschnittliche Schichthöhe von 1,3 mm sich berechnet. Da der Boden der Petrischalen gewöhnlich etwas gewölbt ist, fand ich die Schicht am Rande 2 bis 2,5 mm, in der Mitte etwa 1 mm dick.

Ein Paar Platten (erhitzt und nicht erhitzt) wurden sofort nach der Herstellung unter die Glocke gebracht und diese evakuiert, die übrigen blieben verschieden lange Zeit an Luft stehen unter geräumigen tubulierten Glocken, die ein Verdunsten von Wasser aus dem Agar möglichst verhindern, dagegen vollen Luftzutritt gestatten sollten. Die Petrischalen stellte ich nicht, wie es jetzt vielfach üblich ist, mit der Schichtseite nach oben, da das bei meiner Versuchsanstellung nicht vermeidliche Kondenswasser oft am Rande herabließ und die Petrischale nach außen abschloß. Ich mußte das vermeiden, da sowieso der Gasaustausch zwischen dem Inneren der Glocke und der Außenluft bei ruhigem Stehen in der Hauptsache durch Diffusion also nur langsam stattfinden dürfte. Daß übrigens der Gasaustausch nicht schnell zu sein braucht, lehrt eine angenäherte Berechnung des Gewichtes des Impfmateri als und des im Agar gelösten Sauerstoffs. Die Zahl der lebensfähigen Keime betrug pro Platte höchstens 150 000. Nimmt man Stäbchen von 4 μ Länge und 1 μ Dicke und einem spez. Gewicht von 1,35 an, so ergibt sich ein Gewicht von 0,000636 mg 150 000 Keime. Das Gewicht des in 7 ccm Agar enthaltenen Sauerstoffs ist bei Sättigung unter

1/5 Atm. gleich 0,060 mg (15° C). Selbst wenn man annimmt, daß die Anaëroben pro Tag bis 50 Proz. ihres Körpergewichtes an Sauerstoff verbrauchten, so ist doch allein das Gewicht des im Agar disponiblen Sauerstoffs etwa 200mal so groß, wie das des täglich veratmeten Quantums. Der Aktionsradius eines einzelnen Stäbchens ist bei 150 000/7 ccm Agar gleich 0,224 mm. In so kleinen Räumen wird eine durch Atmung hervorgerufene Konzentrationsdifferenz sehr schnell wieder ausgeglichen. Man sieht aus dieser Betrachtung auch, daß die Dichte der Aussaat in weiten Grenzen ohne Einfluß auf die Wirksamkeit des Sauerstoffs sein muß. Ich habe das in einigen gelegentlich angestellten Versuchen bestätigen können, bei denen gleiches Material in verschiedenen Verdünnungen verwendet wurde. Die Zahl der Kolonien stand mit dem Grade der Verdünnung in reziprokem Verhältnis und zwar sowohl bei den Platten, die nur sehr kurze, als denen, die lange Zeit an Luft gestanden hatten.

Es ist nun die Frage wichtig, in welcher Zeit der in Agar gelöste Sauerstoff durch die Evakuierung wieder entfernt wird. Die Bewegung des Sauerstoffs in Agar findet nur durch Diffusion statt. Der Fall ist hier zunächst der gleiche, wie bei der Diffusion zweier aneinandergrenzender Salzlösungen, bei denen fortwährend das Konzentrationsgefälle sich ändert, während die Konzentrationsdifferenz zwischen den Bewegungen des jeweiligen Diffusionszylinders die gleiche bleibt. Nehmen wir, wie das von meinen Versuchen gelten kann, einen Agarzylinder von 0,2 cm Höhe (l) und 7,5 cm Durchmesser resp. 44,2 qcm Fläche (q) an. Während der Evakuierung und des Einleitens von Wasserstoff wird auf der einen Seite des Agarzylinders eine Sauerstoffkonzentration aufrechterhalten, die gegenüber der im Agar sehr gering ist, also vernachlässigt werden darf. Machen wir nun die weitere vereinfachende Annahme, daß auf der anderen Seite des Agarzylinders für eine konstante Sauerstoffkonzentration von 0,6 Vol.-Proz. gleich 0,00000858 g pro ccm gesorgt ist, so ist die in der Zeit t durch den Querschnitt fließende Menge Sauerstoff

$$Q = D \cdot \frac{c}{l} \cdot q \cdot t$$

wobei D der Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in Agar ist, der mit Annäherung gleich dem in Wasser zu setzen ist (gleich 0,000019681).

Wir können nun Q für t = 1 Sekunde berechnen.

$$Q/\text{sec.} = 0,000000037341 \text{ g.}$$

In 8,82 ccm Agar sind dagegen vorhanden

$$G = 0,000076 \text{ g Sauerstoff.}$$

Diese Menge würde also in $t_1 = 2033,2$ Sek. diffundieren. Die Bedingungen für die Gültigkeit obiger Gleichung sind vorhanden. Es ändert sich jedoch bis zu dem Zeitpunkt, in dem die Diffusion gerade an der hinteren dem Glase anliegenden Fläche des Agarzylinders beginnt, die Länge des Zylinders von 0 bis 0,2 cm. Sie beträgt also im Mittel 0,1 cm. Das Konzentrationsgefälle ist demnach durchschnittlich doppelt so groß als am Ende dieser Phase. Außerdem wird in dieser Zeit nur die Hälfte des Sauerstoffs aus dem Agar heraus diffundieren. Diese erste Phase dauert also

$$t_1/4 = 508,3 \text{ Sek.}$$

Von diesem Zeitpunkt an wird die Konzentration an der hinteren Fläche des Agarzylinders kontinuierlich abnehmen. Hat dieselbe den halben Wert erreicht, so ist auch Q nur noch halb so groß wie am Ende der ersten Phase.

In diesem zweiten Zeitabschnitt wird also in der Zeiteinheit durchschnittlich $\frac{3}{4} \varrho$ /Sek. diffundieren, im ganzen dagegen $\frac{1}{4} G$ und wir erhalten

$$\frac{G}{\frac{3}{4} \varrho} = \frac{t_1}{\frac{1}{3}} = 677,7 \text{ Sek.}$$

Berechnen wir weiter auf dieselbe Weise die Zeiten, die vom Zustandekommen der Konzentration $c/2$ bis $c/4$; $c/4$ bis $c/8$ usw. verstreichen, so finden wir, daß sie gleich sind. Es gilt dann, daß in der Zeit $n(\frac{t_1}{3})$ die Konzentration $\frac{c}{2^n}$ erreicht wird. $c/1024$ wird danach in fast genau 2 Stunden eingetreten sein. ($10 \cdot 677,7 + 508,3 = 7385$ Sek.)

Die Zeit von Beginn der ersten bis zum Ende der dritten Evakuations betrug meist etwa 40 Minuten. $(\frac{t_1}{4} + 3\frac{t_1}{3})$. Der Sauerstoff war dann also durchschnittlich auf $\frac{1}{16}$ der ursprünglichen Konzentration verdünnt. Diese Menge verteilt sich nun bis zum Eintritt des Gleichgewichts auf das Gasvolumen unter der Glocke. Dieses Gasvolumen war in meinen Versuchen mindestens 15mal größer, als das Agarvolumen der unter der Glocke befindlichen Platten. Ist der Absorptionskoeffizient dem Henryschen Gesetze entsprechend bei sehr niedrigem Drucke wenigstens annähernd gleich dem bei 1 Atm., so ergibt sich, daß das Gleichgewicht eintritt bei einer Konzentration, die etwa $\frac{1}{8000}$ der anfänglichen beträgt. Dabei ist wie in den früheren Betrachtungen die Temperatur von 15°C angenommen worden. Da ich jedoch stets die Glocke nach der Evakuations sofort ins Wohnzimmer stellte, wurde der Prozeß der Diffusion beschleunigt und die Grenzkonzentration herabgesetzt. Die Verzögerung der Diffusion durch Erhöhung der Konzentration außerhalb des Agarzylinders ist sehr gering und beträgt bis zum Eintritt einer Konzentration von $c/1024$ selbst im ungünstigsten Falle nicht mehr als 2 Minuten.

Aus diesen Betrachtungen geht vor allen Dingen hervor, daß bis zum Eintreten einer Konzentration des Sauerstoffs die bedeutend unter der schädlichen Mindestkonzentration liegt, also sicher Wachstumsbedingungen bietet, eine bestimmte Zeit vergeht, die bei meinen Versuchsbedingungen nur abhängig ist von der Schichthöhe des Agars. Sie wird proportional dieser 60 bis 160 Minuten, durchschnittlich 80 Minuten betragen. Wenn wir diese Zeit der schädigenden Wirkung eines kontinuierlich abnehmenden Sauerstoffdruckes zu der des vollen Luftzutritts hinzurechnen, so wird die Gesamtzeit der schädlichen Wirkung eher zu lang als zu kurz bemessen sein. Der Fehler ist aber bei allen Versuchen der gleiche, vor allem ist er unabhängig von der Größe der Glocken und der Zahl der Kulturen, die ich unter einer Glocke züchtete.

Es sind nun noch einige Vorversuche zu erwähnen, auf die ich schon hingewiesen habe, nämlich über die Hitzeresistenz der Sporen. Es lag mir daran, die Dauer der Erhitzung zu erfahren, nach welcher möglichst alle Vegetative, dagegen noch möglichst wenig Sporen getötet wären. Ich wählte selbstverständlich dieselbe Versuchsanordnung, die ich bei meinen späteren Versuchen anwenden wollte. Es wurden also die Keime im verflüssigten Agar von 45 bis 50° verteilt und sofort die erste Platte mit „nicht erhitztem“ Material gegossen. Der Rest des Agars (im Erlenneyer-Kölbchen) wurde durch Schwenken in kochendem Wasser erhitzt und während fort-

dauernder Erhitzung wurden in kurzen Zeitabschnitten gleiche Mengen Agars zum Plattenguß entnommen. Dazu wurde jedesmal eine neue sterile Pipette benutzt. Die Hitzegrade, welche bei dieser Methode erreicht werden, sind etwa folgende:

Erhitzung			Abkühlung (an Luft)		
$\frac{1}{2}$	Min.	60°	$\frac{1}{2}$	Min.	87°
1 $\frac{1}{2}$	„	83°	1	„	82°
2	„	87°	1 $\frac{1}{2}$	„	78°
2 $\frac{1}{2}$	„	91°	2	„	76°
3	„	92°			

Von da ab sehr langsames Ansteigen.

Die Abkühlung geht in der Petrischale wegen der größeren Oberfläche bedeutend schneller vonstatten als in Erlenmeyer-Kölbchen, wofür die angegebenen Werte gelten.

In der folgenden Tabelle I habe ich für die erste jeweils nicht erhitzte Platte eines Versuches die absolute Zahl der entstandenen Kolonien angegeben (3. Kolumne). Wieviel Prozent von diesen nach wechselnder Erhitzungsdauer am Leben geblieben waren, ist in der 4. bis 12. Kolumne zusammengestellt.

Tabelle I.

Alter der Vor- kultur in Tagen	Spezies	Nicht erhitzte 1. Platte Zahl der Kolonien	Erhitzungsdauer in Minuten Prozente der Kolonienzahl im Verhältnis zur 1. Platte								
			$\frac{1}{2}$	1	1 $\frac{1}{2}$	2	3	4	5	7	8
6	<i>Bac. botulinus</i>	2000	70	50	—	17	—	1,3	—	0	—
13	„	250	—	—	—	22	2	0,25	—	—	—
22	„	58	—	—	—	—	1,9	—	—	—	—
3	<i>Parapl. foetidum</i>	2500	—	24	—	2	8	—	0	—	0
35	„	540	—	—	80	—	—	—	—	—	—
—	<i>Bac. amylobacter</i>	290	—	—	—	91	—	—	—	—	—
—	<i>Bac. Chauveauxi</i>	350	50	41	—	—	20	—	4	0	—

Für *Bacillus amylobacter* liegen noch einige Versuche vor, bei denen ich ganz sporenfreies Material verwendete. Das Wachstum blieb auf allen Platten aus. Ich durfte daher annehmen, daß durch die Erhitzung von $1\frac{3}{4}$ bis 2 Minuten alle Vegetativen getötet würden, von den Sporen dagegen nur wenig. Denselben Wert konnte ich für *Paraplectrum foetidum* gelten lassen, da bei älterem, fast reinem Sporenmaterial nach $1\frac{1}{2}$ Minuten nur 20 Proz., bei sporenärmerem dagegen etwa 80 Proz. vernichtet waren. Bei *Bacillus botulinus* durfte die Erhitzung 2 Minuten keinesfalls überschreiten, da nach dieser Zeit schon zu viel Sporen (13 Tage altes Material) getötet waren. Es ist übrigens auffallend, daß bei *Bacillus botulinus* prozentual gleichviel Keime durch dreiminütiges Erhitzen vernichtet wurden, bei 6 Tage wie bei 22 Tage altem Versuchsmaterial. Es liegt der Gedanke nahe, daß auf der nicht erhitzten Platte auch bei 6 Tage altem Material nur Sporen ausgekeimt seien.

Bezüglich der Wirkung der Temperatur des geschmolzenen Agars (ca. 45°) auf die Vegetativen verweise ich auf p. 16 u. 20.

III. Die Versuche.

A. Die Vegetativen.

1. Verhalten der vegetativen Keime gegen Einwirkung des Sauerstoffs der Luft.

Die Methode ist im allgemeinen schon auf Seite 8 beschrieben, doch muß ich noch einige Einzelheiten hinzufügen.

Die Impfung nahm ich zu Beginn meiner Untersuchungen im Dampfkasten vor, ließ aber später diese Vorsichtsmaßregel außer Acht, da ich bei ruhigem Hantieren ohne sie die gleichen Resultate erzielte. Eine Infektion erfolgte zuweilen, aber nur vom Rande her, fast stets durch *Penicillium*, das meist noch rechtzeitig entfernt werden konnte.

Direkt nach jedem Versuch wurde, ehe die Resultate mir bekannt waren, durch die mikroskopische Untersuchung festgestellt, ob Sporen im verwendeten Materiale vorhanden seien oder nicht. Ich fertigte mir zu diesem Zwecke Dauerpräparate an. Zur Färbung verwendete ich nach Ziehl heißes Karbol-fuchsin und wusch in 1 proz. Schwefelsäure nach. Ich habe so recht genaue Resultate erzielt. Bis zu einem weiten Entwicklungsstadium ist die Spore gegen das sie umgebende Plasma unscharf abgegrenzt, und erst wenn die definitive Größe erreicht ist, wird die Sporenhaut gebildet und es entstehen scharfe Konturen. Besonders günstig sind diese Verhältnisse bei *Bacillus amylobacter* ausgeprägt. Die beiden anderen Arten zeigen viel mannigfaltigere Übergangsformen, die sich schwer auseinanderhalten lassen. Die sehr bequeme Jodfärbung, die bei *Bacillus amylobacter* in Frage käme, gibt nach meinen Erfahrungen nur ein unsicheres Kriterium über den Reifezustand der Sporen. Ganz zum Schlusse meiner Untersuchung habe ich alle Dauerpräparate noch einmal unabhängig von den Protokollen geprüft. Auf diese Weise ist für vorurteilslose und objektive Angaben Gewähr geleistet.

Die Kolonienzahl habe ich bis zu 1000 oder 1500 ohne optische Hilfsmittel durch Abzählung der ganzen Platte oder eines Quadranten oder Oktanten derselben bestimmt, höhere Zahlen mit dem Mikroskop (Leitz, Oc. 2, Obj. 3), da die Kolonien schließlich so klein blieben, daß sie mit bloßem Auge schwer zu unterscheiden waren. Der Mittelwert von mehreren Zählungen wurde notiert. Die Fehlergrenze der Zählungen ist am weitesten bei 1000 bis 2000 Kolonien, da in diesen Fällen nur deren zwei ins Gesichtsfeld fallen.

In den folgenden Tabellen II—IV habe ich die Ergebnisse derjenigen Versuche zusammengestellt, bei denen ich durch die mikroskopische Untersuchung keine Sporen konstatieren konnte. Auch solche Stäbchen, bei denen die Sporenbildung schon begonnen hatte oder etwas vorgeschrittener war, wurden noch zu den Vegetativen gerechnet.

Die in jeder wagerechten Reihe stehenden Werte stammen von einer Vorkultur und einer Verdünnung derselben. Die eingeklammerten Ziffern gelten für die erhitzten Kontrollkulturen. In der zweiten senkrechten Kolumne sind die mikroskopischen Befunde kurz angegeben. In den beiden nächsten Kolumnen ist für die jeweils kürzeste Zeit der Lufteinwirkung die absolute Zahl der Kolonien angegeben. Die Werte der folgenden Kolumnen bedeuten Prozente dieser Zahlen.

Vgl. Tab. II—IV.

Übereinstimmend habe ich von den drei untersuchten Arten in einigen Versuchen auch bei kürzester Lufteinwirkung kein Wachstum erhalten. In diesen Fällen war stets — was ich ausdrücklich erwähnen muß — auf mit

Sporenmaterial geimpften Kontrollplatten Wachstum erfolgt. Die Impfung war stets so reichlich, daß mindestens mehrere 100 bis 1000 Kolonien zu erwarten waren. Auf die Wirkung der Temperatur des geschmolzenen Agars werde ich noch eingehen (p. 16).

Tabelle II.
Paraplectrum foetidum.

No. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—30 Minuten an Luft	35—60 Minuten	7—8 Std.	20—24 Std.	2—3 Tage	4—6 Tage	7—8 Tage	14 Tage	Alter der Vorkultur
1	rein vegetativ	457 (10)				0,5 (0)	0 (0)			3
2	beginnendes Wachstum	150 (40)							1,3	1
3	nur ganz junge Stäbchen	10 (0)		1 Kol. (2 Kol.)			0 (0)			4
4	ebenso	3 (0)				0 (0)				1
5	ebenso	5200 (318)		17 (28)	8,9 (17)					3
6	viel ganz junge Stäbchen	2500 (0)		11 (0)	23,2 (0)					—
7	ältere Stäbchen	0 (0)				0 (0)				2
8	Beginn der Sporenbildung		0 (0)			4 Kol.				4
9	ältere Stäbchen	0 (0)				0 (0)				2
10	wenig Sporenträger		397 (0)				0 (0)	0 —		5
11	ebenso	140 (0)			0 (0)					3
12	viel Sporenträger	4000 (12)			2,8 (0)		0,05 (0)			4
13	ebenso	2000 (12)					0 (0)			4
14	ebenso ältere Stäbchen		8 (0)				0 (0)			3
15	viel Sporenträger		0 (0)			0 (0)				2
16	Fast nur Sporenträger	0 (0)				0 0 (0) (0)				1
17	Vegetative und Sporenträger	0 (0)				0 0 (0) (0)				1

Am empfindlichsten ist *Bacillus amylobacter* (Tabelle IV). Bei den Versuchen 24 bis 28 blieb das Wachstum überhaupt aus. Versuch 23 ist schwer zu erklären, da ja anscheinend Sporen vorhanden waren (erhitzte Kontrolle), die nach 2- bis 5-stündiger Lufteinwirkung unmöglich getötet sein konnten. Es handelt sich um einen der ersten Versuche, die ich in dieser Richtung angestellt habe. Es liegt daher der Gedanke an einen technischen

Tabelle III.
Bacillus botulinus.

No. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—30 Minuten an Luft	35—60 Minuten	8 Stunden	2 Tage	3 Tage	5 Tage	Alter der Vorkultur (Tage)
18a	ganz jung vegetativ	2300 (500)				104 (100)		1
18b		133 (43)				96 (150)		1
19	rein vegetativ	0 (0)			0 (0)			1
20	ganz jung	0 (0)				37 K (6)	6 K —	1
21	keine reifen Sporen		195 (5)				0 (0)	5
22	ebenso	4 (0)		0 (0)				3
23	junge Sporenstadien	450 (0)			48 (0)			4

Tabelle IV.
Bacillus amylobacter.

No. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—30 Minuten an Luft	35—60 Minuten	1—2 Std.	3—5 Std.	6 Stunden	20 Stunden	Alter der Vorkultur (Tage)
24	junges Material		Wachstum (143)	0 (0)	0 (0)			4 Pl. ¹⁾
25	rein vegetativ		0 (0)	0 (0)		2 K (2 K)		3
26	keine reifen Sporen			0 (0)	0 (0)			5 Pl. ¹⁾
27	ebenso	0 (0)			0 (0)			3
28	ebenso	0 (0)					0 (0)	1

Fehler bei der Evakuierung nahe, dem das Ausbleiben des Wachstums auf dem zweiten und dritten Plattenpaar zuzuschreiben wäre. Für mich ist dieser Versuch deshalb auch die Ursache gewesen, die schon erwähnten Kontrollkulturen mit Sporenmaterial einzuführen. Ich hätte diesen zweifellos mangelhaften Versuch nicht mit in die Arbeit aufgenommen, wenn er nicht die Deutung zuließe, daß durch ein Versehen der Numerierung zwei nicht erhitze Kulturen unter die erste Glocke gekommen seien. Es wäre das der einzige Fall, in dem ich bei der hier angewandten Methode von den vegetativen

¹⁾ Vorkultur in Petrischale auf Agar, alle übrigen in Bouillon unter Wright-Burri-Verschluß.

Formen des *Bacillus amylobacter* überhaupt Wachstum erhalten hätte.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei *Paraplectrum foetidum* und *Bacillus botulinus*. In mehreren Versuchen erfolgte sehr erhebliches Wachstum und zwar vielfach auch bei dem erhitzten Material. — Für *Paraplectrum foetidum* (Tabelle II) zeigt Versuch 5 wohl am deutlichsten daß die hitzeresistenten Formen keineswegs nur physiologisch vollwertige Sporen sein können, da auch bei den erhitzten Kulturen in 7 Stunden eine Abnahme der Kolonienzahl um 72 Proz. zu konstatieren ist, prozentual wenig verschieden von der im nicht erhitzten Material (83 Proz.). Aus dieser Gleichartigkeit des Verhaltens gegen die Lufteinwirkung dürfen wir, wenn wir den mikroskopischen Befund berücksichtigen, den Schluß ziehen, daß es sich auch bei den hitzeresistenten Formen größtenteils um Vegetative handelt. Nach siebenstündiger Lufteinwirkung würden also noch nicht alle Vegetativen getötet sein, ebenso vermutlich nach 20 Stunden. Zunächst ist der Unterschied zwischen dem Resultat dieses Versuches und den schon erwähnten, bei denen überhaupt keine Kolonienbildung erfolgte, zweifellos auffällig. Es liegt indes hier entschieden eine Beziehung der Widerstandsfähigkeit zum Entwicklungsstadium vor. Die Versuche 1, 2, 5, 6 zeigen nur ganz junge Formen, die Versuche 12 und 13 sehr viel Sporenträger. Auch in diesen letzteren Fällen können wir, wie besonders Versuch 12 zeigt, nicht annehmen, daß wir es — bei der rapiden Abnahme der Kolonienzahl um 97 Proz. in einem Tage — nur mit reifen Sporen zu tun hätten. Die Maximaltötungszeit dürfte hier 20 Stunden kaum überschreiten.

Bei *Bacillus botulinus* sprechen nur die Versuche 21 und 23 dafür, daß vorgeschrittene Sporenentwicklungsstadien eine kurze Sauerstoffeinwirkung vertragen. Der Versuch 18 ist unbedingt nicht mit rein vegetativem Material ausgeführt. Das geht schon mit Sicherheit hervor aus dem Gleichbleiben der Kolonienzahl nach mehrtägiger Einwirkung der Luft. Es kann sich nun hier nur um noch nicht ausgekeimte Sporen handeln. Eine Neubildung davon kann nicht in Frage kommen. Ich impfte die Vorkultur mit einer Oese fast reinen und sehr lebenskräftigen Sporenmaterials. Man kann sich leicht überzeugen, daß damit mehr als 50 000 bis 100 000 Sporen übertragen werden. Bei Versuch 18 a habe ich nun außerordentlich stark geimpft, nämlich mit 2 ccm der Vorkultur, die eine leichte Trübung aufwies. Es hätten, wie ich mir berechnete, auf jeder Platte etwa 200 000 Kolonien entstehen müssen. 99 Proz. der geimpften Keime ist also schon nach 25-minütigem Verweilen an Luft nicht mehr entwicklungsfähig. Es bedarf keines weiteren Beweises, daß das letzte Prozent physiologisch von den übrigen different ist und daß es sich hierbei um Sporen handeln muß.

Übrigens konnte ich bei allen Versuchen der Tabellen II—IV konstatieren, daß die Zahl der Kolonien auch bei dem ersten Plattenpaar weit hinter der der geimpften Keime zurücksteht. Die Bestimmung der letzteren habe ich nicht mit viel Genauigkeit vorgenommen, die in folgender Zusammenstellung angegebenen Werte sind jedoch wahrscheinlich alle noch zu niedrig.

Bacillus botulinus.

erhalten	Versuch	18a	erwartet
2300			200 000
155	„	18b	7 000
4	„	22	10 000
450	„	23	15 000

Paraplectrum foetidum.			
erhalten		Versuch	erwartet
457		1	50 000
150		2	7 000
5200		5	30 000
2500		6	200 000
140		11	5 000
2000		13	17 000

Aus dieser Übersicht geht vor allem wiederum hervor, daß in den Versuchen 5 und 13 relativ viel gegen Sauerstoff resistentes Material vorhanden war, das bei der mikroskopischen Untersuchung mir nicht hätte entgehen können, wenn es sich um reife Sporen gehandelt hätte.

Es ist sehr auffallend, daß die Vegetativen meiner Anaëroben in so außerordentlich kurzer Zeit durch den Sauerstoff dermaßen geschädigt werden, daß sie ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren, zumal wenn das als Zeichen ihres Todes angesehen werden darf. Gegen meine bisherigen Versuche kann man vor allem einwenden, daß die Vegetativen schon durch die Temperatur des geschmolzenen Agars, die 45 bis 50° C betragen muß, wenn die Versuche beendet werden sollen, ohne daß der Agar vorzeitig erstarrt, vernichtet werden könnten. In diesem Falle würden natürlich meine bisherigen Resultate über die tödliche Wirkung des Luftsauerstoffs nichts aussagen.

Es wurden daher einige neue Versuche angestellt, die im Prinzip meinen ersten Versuchen entsprachen, welche ich nicht fortgesetzt hatte, da sie nur qualitativ über Wachstum und Nichtwachstum sicher entscheiden können. Ich verschaffte mir ganz junges Material, das so gut wie sporenfrei war und strich eine Oese davon ohne Verdünnung direkt auf eine frisch gegossene und getrocknete Agarplatte. Mit der schon fertigen Kontrollkultur (Sporenmaterial) und Pyrogallat wurde sofort evakuiert und nach 6 Tagen untersucht.

Parapl. foet.:	I. 1. 15 Min.	an Luft	15 Kolonien
" "	2. 4 Tage	" "	5 "
" "	II. 1. 10 Min.	" "	0 "
" "	2. 10 "	" "	0 "
Bac. botul.:	I. 1. 10 "	" "	kräftiges Wachstum
" "	2. 10 "	" "	am Beginn d. Striches
" "	II. 1. 15 "	" "	8 Kolonien
" "	2. 1 Tag	" "	4 "
Bac. amylob.	I. 1. 10 Min.	" "	0 "
" "	2. 3 Tage	" "	54 "

In diesen Versuchen ist die Temperaturerhöhung als Todesursache ausgeschlossen. Bei dem 1. Versuch mit *Bac. botulinus* waren im Versuchsmaterial schon reichlich Sporenträger vorhanden, so daß das kräftige Wachstum am Beginn des Striches sowohl auf höhere Widerstandsfähigkeit (s. Versuche 21 und 23, Tabelle III) als auf dichtere Anhäufung der Individuen zurückgeführt werden kann. Die Gefahr der Verunreinigung mit reifen Sporen ist natürlich am Beginn des Striches auch am größten. — Auf das merkwürdige Verhalten des *Bac. amylobacter* werde ich später noch zurückkommen. Jedenfalls haben auch seine Vegetativen nach einer Luftwirkung von 10 Minuten Dauer ihre Vermehrungsfähigkeit verloren.

Wir haben nun, wie ich eingehend auseinandergesetzt habe, zu der jeweiligen Zeit vollen Luftzutritts noch die im allgemeinen konstante der Wirkung eines dauernd abnehmenden Partiärdruckes des Sauerstoffs zuzurechnen,

die auch bei den letzten Versuchen mit Oberflächenkulturen nicht ganz zu vernachlässigen ist, da dort zwar nach dem Auspumpen rein statisch betrachtet, der Partiärdruck nach wenigen Minuten sehr gering ist, während doch aus der Tiefe dauernd Sauerstoff durch die Oberfläche fließt. Ich vermochte diese Zeit bedeutend abzukürzen, indem ich mit dem anaëroben *Bacillus* einen obligat aëroben aussäete. Jedes aërobe Stäbchen wird in seiner nächsten Umgebung eine Zone geringeren Sauerstoffdruckes schaffen und ein ihm anliegendes anaërobes Stäbchen wird dadurch sehr schnell Wachstumsbedingungen finden.

Herr Professor K. Shibata überließ mir liebenswürdiger Weise eine ausgezeichnete Reinkultur eines aëroben *Bacillus* unbestimmter Art, der sich von meinen Anaëroben durch seine Dimensionen sehr leicht unterscheiden ließ. Ich stellte zunächst fest, daß dieser *Bacillus* ohne Sauerstoff nicht zu wachsen imstande ist und stellte dann folgende zwei Versuche mit ihm an. — Ich verwendete natürlichst möglichst junges Anaërobenmaterial, impfte sehr reichlich und gab dann einige Tropfen aus einer Bouillonkultur des Aëroben zu.

Bacillus botulinus.

10 Min. an Luft	1. ohne Aërobier	ca.	78 Kol.
	2. mit „	ca. 2 000 000	„

Bacillus amylobacter.

10 Min. an Luft	1. ohne Aërobier	0 Kol.
	2. mit „	150 „
2 Tage „ „	3. ohne „	8 „

Bei *Bac. botulinus* zeigt das Resultat in überzeugender Weise den günstigen Einfluß des aëroben *Bacillus*. Auch *Bac. amylobacter* hat eine gewisse Förderung erfahren. Ob die 150 Kolonien aber wirklich aus vegetativen Keimen entstanden sind, ist nicht ersichtlich. Es sind ja sicher Sporen vorhanden gewesen, die möglicherweise durch Stoffwechselprodukte der Aëroben in besonderer Weise zur Keimung angeregt wurden. Auf alle Fälle ist die Zahl der nach 15 Minuten ungehinderten Luftzutritts am Leben gebliebenen vegetativen Zustände verschwindend gering.

Für *Paraplectrum foetidum* liegt ein entsprechender Versuch nicht vor. Es gelang mir in einigen Versuchen mit *Paraplectrum* mittels Natriumhydrosulfit und Indigkarmin Sauerstofffreiheit des Nährbodens zu erreichen, noch ehe er zur Evakuierung unter die Glocke kam. Doch ich erhielt kein Wachstum. Gerade für diese Art sind indes alle Versuche mit Natriumhydrosulfit nicht einwandfrei, da die von dieser Substanz in wässriger Lösung gebildeten Gase (SO_2) für *Paraplectrum foetidum* außerordentlich giftig sind, wie ich mich durch sofortige Sistierung der Bewegung in Hängetropfenkulturen überzeugen konnte. — Ich setzte auch Kulturen auf Agarplatten an, die schon einen Tag in Wasserstoffatmosphäre gestanden hatten und nahm die Impfung bei 6 bis 7° C vor, aber ohne Erfolg.

2. Verhalten der Vegetativen bei Umimpfung ohne Luftzutritt.

Es ist ein Nachteil der bisher beschriebenen Versuche, daß stets nur verschieden lange Einwirkungszeiten des Sauerstoffes verglichen wurden und, da ich bei *Bac. botulinus* nur selten, bei *Bac. amylobacter* überhaupt nicht sicher von Vegetativen ausgehendes Wachstum erhalten habe, mußte ich in einigen Versuchen unter sonst ähnlichen Bedingungen die Impfung ohne Luftzutritt vornehmen. Nur so konnte ich dem Einwand begegnen,

daß die Versuchsanordnung an sich, die ja in mehrfacher Beziehung die Lebensbedingungen des Impfmateri als änderte, die Vegetativen, ohne sie gerade zu töten, an der Vermehrung und damit der Kolonienbildung hinderte. Neben Kulturen ohne Luftzutritt mußte ich zu besserem Vergleiche auch solche anlegen, bei denen ich mit der hier verwendeten Methode die Einwirkung des Sauerstoffs neuerdings prüfte. Die Überimpfung in den Agar mußte jedoch auch in diesen Fällen bei Luftabschluß geschehen, sodaß, so lange der Sauerstoff einwirkte, keine schädliche unkontrollierbare Nebenwirkung im Spiele war.

Ich verwendete zu diesen Versuchen 2-Schenkelröhrchen von A-Form. In den einen Schenkel kamen $3\frac{1}{2}$ ccm Agar, in den anderen 2 ccm Bouillon, beides mit Indigkarminblau gefärbt. Vor dem Versuch wurden Agar und Bouillon ausgekocht und dann wurde die noch heiße Bouillon mit kräftigem Sporenmaterial geimpft, der sterile Wattestopfen etwas tiefer geschoben und über ihm ein Gummistopfen mit Glasröhre fest eingedreht. Nunmehr stellte ich die Verbindung mit der Luftpumpe her und begann langsam zu pumpen, zugleich wurden die beiden Schenkel in kaltes Wasser getaucht, sodaß ein störendes Aufschäumen und Verspritzen des Nährbodens vermieden wurde.

Alle Manipulationen von der Impfung bis zum Beginn des Pumpens suchte ich sehr zu beschleunigen, damit der Luft möglichst wenig Gelegenheit geboten würde, in den Nährboden einzudringen.¹⁾ Nach dreimaligem Evakuieren und Einleiten von Wasserstoff wurde die Glasröhre an einer vorher ausgezogenen Stelle abgeschmolzen und das fertige 2-Schenkelröhrchen unter Wasser bei 31° gehalten.

Im Laufe des folgenden Tages trat gewöhnlich Wachstum ein. Es wurde nun bei geschlossenen Röhrchen mikroskopisch untersucht (s. p. 45), ob etwa die Sporenbildung schon begonnen hätte. Erschien das Material rein vegetativ, so wurde entweder bei geschlossenem Röhrchen in den Agar geimpft (s. u.) oder das Röhrchen wurde geöffnet und nach Einleiten von Luft — eventuell nach Verdünnung der bewachsenen Bouillon mit steriler — in fast wagerechter Lage dem Einfluß der Luft überlassen, ab und zu auch geschüttelt. Nach einiger Zeit der Lufteinwirkung wurde das Röhrchen in der beschriebenen Weise wieder evakuiert und dann erst geimpft. Zu diesem Zwecke wurde der Agar in kochendem Wasser verflüssigt, wobei der andere Schenkel vor Erhitzung geschützt wurde. Nach Abkühlung auf etwa 45° wurde ein Tropfen der Bouillonkultur durch vorsichtiges Neigen des Röhrchens übergegossen. Nachdem durch Schütteln die Keime gut verteilt waren, wurde der Agar im Wasserstrahl zur Erstarrung gebracht, und das 2-Schenkelröhrchen im Wärmezimmer unter Wasser gestellt.

In folgendem Protokollauszuge teile ich nur die Versuche mit, die methodisch, wie beschrieben, gleichartig ausgeführt wurden. Natriumhydrosulfit

¹⁾ Ich versuchte eine Zeitlang, mit Hilfe von Schützenbergers Reagens den Sauerstoff noch vollständiger zu beseitigen. Das gelang auch sehr gut, aber es zeigte sich, daß, auch wenn das als Indikator dienende Indigkarmin durch das Natriumhydrosulfit nicht ganz entfärbt wurde, eine schädliche Wirkung desselben nicht zu verkennen war. *Bac. amylobacter* zeigte zwar üppiges Wachstum, aber deutlich degenerative Formen, bei *Paraplectrum foetidum* wurde die Sporenkeimung völlig verhindert, oder doch die Zahl der keimenden Sporen verringert. Bei Anwesenheit von Natriumhydrosulfit entstehen vermutlich abnorme Stoffwechselprodukte; während der normale Geruch meiner Arten noch relativ angenehm war, stanken Hydrosulfitkulturen intensiv merkaptanähnlich. Es ist möglich, daß hierauf die Giftwirkung zurückzuführen ist.

wurde nicht mehr verwendet. Die erste Angabe über Wachstum bezieht sich auf dasjenige in der Bouillon (Vorkultur). Ist über Öffnen und Luftwirkung nichts besonderes angegeben, so wurde bei geschlossenem Röhrchen übergeimpft. Die Angaben nach dem Strich — gelten für das Wachstum im Agar. Die Zahl der Kolonien pro Gesichtsfeld (Leitz, Oc. 2, Obj. 3 od. 5) ist bei jedem Versuch angegeben (Abkürzung: z. B. 400/G. F.).

Die Versuche, welche an einem Tage angesetzt wurden, habe ich in Gruppen zusammengestellt (römische Ziffern), da sie mit besserem Rechte untereinander verglichen werden dürfen als mit den übrigen.

Buttersäure-Bacillus.

I.

1. Beginnendes Wachstum nur vegetativ, Impfung mit 1 Tropfen — sehr kräftiges Wachstum 400/G. F.

2. a) Kräftiges vegetatives Wachstum, geöffnet, Luft eingeleitet; zu den 2 ccm bewachsener Bouillon werden 15 ccm steriler Bouillon zugegeben (Verdünnung ungefähr 8-fach). Von diesem verdünnten Material werden zwei ccm in ein zweites 2-Schenkelröhrchen (b) gegossen und auch in dem ersten (a) nur 2 ccm Material gelassen, das übrige abgegossen.

a) 18½ Stunden an Luft — 200 Kol. ½/G. F.

b) 47 Stunden an Luft — 60 Kol. ⅙/G. F.

II.

1. Beginnendes Wachstum, scheinbar nur vegetativ, Röhrchen geöffnet, Luft eingeleitet, 2½ Stunden an Luft — kräftiges Wachstum.

2. Nach 3 Wochen kräftiger Bodensatz. Versuch, das Verhalten der Sporen zu prüfen, ob und wann sie Kolonien bilden, wenn sie dem Luftzutritt nicht ausgesetzt wurden. Impfung 1 Tropfen — nach 2 Tagen beginnendes kräftiges Wachstum.

III.

1. Beginnendes Wachstum, geimpft mit 1 Tropfen — sehr kräftiges Wachstum 150/G. F.

2. Beginnendes Wachstum, geöffnet, Luft eingeleitet, an Luft: 17 Stunden — ¼/G. F.

3. Kräftiges Wachstum. Behandelt wie I 2; nach der Verdünnung sind die Keime noch etwa 5mal so dicht wie bei III 2.

a) 18 Stunden an Luft — 50/G. F.

b) 42 Stunden an Luft — ⅙/G. F.

Paraplectrum foetidum.

IV.

1. Beginnendes Wachstum, Impfung 1 Tropfen — 330/G. F.

2. Fortgeschrittenes Wachstum, Impfung ebenso — 150/G. F.

3. Wachstum fraglich, Impfung ebenso — 50/G. F.

4. Beginnendes Wachstum. Impfung 1,2 ccm — 500/G. F.

5. Beginnendes Wachstum. Impfung 1 Tropfen — 340/G. F.

6. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 6½ Stunden — 7/G. F.

7. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 22½ Stunden — 4/G. F.

8. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 10 Minuten — 240/G. F.

Bacillus botulinus.

V.

1. Beginnendes Wachstum. Geimpft mit 1 Tropfen — 90/G. F.

2. Wachstum etwas kräftiger, gleiche Impfung — 250/G. F.

3. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 18½ Stunden — 30/G. F.

4. Gutes Wachstum, Luft eingeleitet, an Luft: 5½ Stunden — 30/G. F.

VI.

1. Kräftiges Wachstum, rein vegetativ, Luft eingeleitet, verdünnt wie I 2; an Luft: 24½ Stunden — 5/G. F.

2. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 24½ Stunden — 25/G. F.

2*

VII.

1. Beginnendes Wachstum, behandelt wie I 2
 - a) an Luft: 5¼ Stunden — 45/G. F.
 - b) an Luft: 12 Minuten — 70/G. F.
2. Beginnendes Wachstum, behandelt wie I 2
 - a) an Luft: 15 Minuten — 40/G. F.
 - b) an Luft: 29 Stunden — 5/G. F.

Da die absolute Zahl der Kolonien, die bei Überimpfung ohne Luftzutritt erhalten wurde, stets außerordentlich groß war (10—50 Tausend), so war eine prozentual wesentliche Beteiligung von Sporen an der Kolonienbildung ausgeschlossen, wenn man die mikroskopische Untersuchung berücksichtigt. Bei „beginnendem Wachstum“ waren stets nur ganz junge Formen ohne Andeutung von Sporenbildung zu sehen. Auch erfolgte die Kolonienbildung stets sehr schnell im Laufe des ersten Tages, während ich in früheren Versuchen (Tabelle II—IV) die Kolonien auf den unter der Glocke befindlichen Petrischalen von außen meist erst am dritten Tage zu erkennen vermochte; allerdings waren sie dann schon recht groß, so daß sie bei näherer Betrachtung sicher schon früher sichtbar gewesen wären. Doch spricht Versuch II₂ (p. 19) dafür, daß, wenigstens bei *Bac. amylobacter*, die Kolonienbildung aus Sporen wesentlich später als aus Vegetativen erfolgt.

Aus alledem geht zweifellos hervor, daß die vegetativen Zustände der drei untersuchten Arten im Agar Kolonien zu bilden vermögen, wenn sie bei der Impfung dem Sauerstoff der Luft überhaupt nicht ausgesetzt werden. Erst damit ist streng bewiesen, daß die schnelle Vernichtung der vegetativen Formen, wie wir sie in den ersten Versuchen festgestellt haben, auf die Einwirkung des Sauerstoffes zurückgeführt werden muß, und im Zusammenhang mit der Tatsache, daß die vegetativen Stadien bei Verteilung im Agar von 45° und bei Aufstrich auf Agar unter dem Einfluß des Sauerstoffes gleich schnell vernichtet wurden, (p. 16) ist zugleich dargetan, daß die Temperatur von 45° die vegetativen Zustände weder direkt wesentlich schädigt, noch die Wirkung des Sauerstoffes wesentlich unterstützt.

Andererseits zeigte sich aber, daß die Vegetativen, wenn die Schenkelschälchen nach Beginn des Wachstums in der Bouillon geöffnet wurden, keineswegs so rasch zugrunde gingen, wie das zu erwarten war. Die Luft müßte doch in die Bouillon schneller eindringen als in den Agar und die Tötungszeit deshalb eher noch kürzer sein, als in den früheren Versuchen.

Nur bei *Paraplectrum foetidum* ist bis zu 6½ Stunden die Mehrzahl der Keime getötet (IV, 6 und 7). *Bac. botulinus* zeigt in 24 Stunden nur eine geringe Abnahme der Kolonienzahl, ähnlich ist es bei *Bac. amylobacter*.

Ich konnte nun dadurch, daß ich die junge Bouillonkultur des einen Schenkels mit steriler Bouillon verdünnte, die Kolonienabnahme sehr beschleunigen, wie es die Versuche I, III, VI, und VII zeigen. Besonders die Versuche unter III zeigen deutlich, wie abhängig die Resistenz der vegetativen Stadien von deren Dichte ist. Nehmen wir an, daß in dem zweiten Versuche dieser Gruppe mit einem Tropfen 100 Keime (pro G. F.), im dritten 500 Keime geimpft wurden, so leben im Versuche III₂ nach 17 Stunden nur noch ¼ Proz., bei III₃ nach 18 Stunden noch 10 Proz. Der Unterschied ist so groß, daß er auch durch verschieden starke Impfung nicht erklärt werden kann. Besonders wichtig ist hierbei, daß bei III₂ das Material nicht verdünnt wurde, daß also die schnellere Vernichtung nicht etwa nur auf die Einführung von Luft mit der zur Verdünnung benutzten Bouillon zurückgeführt werden kann.

Die Verdünnung betrug in diesen Versuchen etwa das achtfache der Ausgangskultur. In den früheren Versuchen wurde nur in einem Falle auf das 22 fache, sonst stets auf mehr als das 100 fache verdünnt. Es erscheint nunmehr verständlich, daß dort die Tötungszeit der Vegetativen erheblich kürzer gefunden wurde.

Eine deutliche Vermehrung hat übrigens in den Versuchen dieses Abschnittes während des Luftzutritts selber auch bei der geringsten Verdünnung nicht stattgefunden, ein Zeichen dafür, daß sich auch hier wenigstens ein hemmender Einfluß des Sauerstoffs geltend machte.

3. Bewegung der Anaëroben bei Luftzutritt.

Die älteste von P a s t e u r stammende Angabe hierüber habe ich schon zitiert. B e i j e r i n c k zeigte, daß die Beweglichkeit seines G r a n u l o - b a c t e r s a c c h a r o b u t y r i c u m bei Luftzutritt wesentlich gesteigert wird¹⁾.

Die Angaben über die Zeit, in der die Bewegung der Anaëroben an Luft sistiert wird, sind sehr verschieden. Eingehendere Arbeiten darüber existieren nicht. Ich möchte nur erwähnen, daß S c h a t t e n f r o h und G r a ß - b e r g e r die Bewegung des „beweglichen Buttersäurebacillus“ in $\frac{1}{4}$ Stunde aufhören sahen, daß dieselbe nach Durchleiten von Wasserstoff durch die Gaskammer wieder zurückkehrte. Diese Autoren entnahmen ihr Beobachtungsmaterial dem Kondenswasser von Agarkulturen und geben an, daß ein Verdünnen desselben mit ausgekochtem Wasser sehr schnell zur Sistierung der Bewegung führte.²⁾

Bei manchen Anaërobenarten scheint die Bewegung an Luft unter Umständen so schnell aufzuhören, daß sie nach Fertigstellung des Präparates nicht mehr beobachtet werden kann. Allerdings ist in diesen Fällen zweifelhaft, ob das Material nicht schon unter anaëroben Bedingungen bewegungslos war. B e i j e r i n c k gibt an, und darin kann ich ihm nur beistimmen, daß die Beweglichkeit auch bei vollem Ausschluß des Sauerstoffs sehr wechselnd ist.³⁾

Besonders merkwürdig liegen scheinbar die Verhältnisse bei B a c i l l u s t e t a n i, der nach S i l v i o d e G r a n d i⁴⁾ Geißeln in großer Zahl ausbildet und trotzdem sich weder bei Luftzutritt noch unter anaëroben Bedingungen — bei guter Vermehrung — beweglich zeigte.

Zu Beginn meiner Untersuchung hatte ich vor, die Dauer der Beweglichkeit meiner Anaëroben bei Luftzutritt zur Kontrolle für die Richtigkeit der gefundenen Tötungszeiten zu benutzen. Ich erhielt jedoch sehr wechselnde Resultate. Der sehr empfindliche B a c . a m y l o b a c t e r blieb oft drei bis vier Stunden, einmal sogar neunzehn Stunden beweglich, P a r a p l e c t r u m f o e t i d u m meist vier bis sieben, zuweilen auch bis zwanzig Stunden. Ich hatte zu diesen Versuchen nicht oder nur wenig verdünntes Material benutzt, und bin erst durch die im letzten Abschnitt geschilderten Versuche dazu veranlaßt worden, stärkere Verdünnungen zu verwenden.

¹⁾ B e i j e r i n c k, Über die Butylalkoholgärung u. d. Butylferment. (Verh. d. Koninkl. Ak. v. Wetensch. te Amsterd. Sect. II. I. No. 10. 1893. p. 27 ff.) (Sep.-Abdr.)

²⁾ S c h a t t e n f r o h u. G r a s s b e r g e r, Über Buttersäuregärung. (Arch. f. Hyg. 42. 1902. p. 232.)

³⁾ B e i j e r i n c k, l. c. 1893.

⁴⁾ S i l v i o d e G r a n d i, Beobachtungen üb. d. Geißeln d. Tet. Bac. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig.-Bd. 42. 1906. p. 103.)

Tabelle V.
Bewegung der Anaëroben.

Species	No.	Grad der Verdünnung	Dauer der Luftwirkung vor dem Evacuieren (Min.)	Beobachtung direkt nach Fertigstellung der Gaskammer	1—2	2—3	3—4	4—6	6—8	8—10	10—20	ca. 24	48	72 u. mehr
Para-plectrum foetidum	I 1	15-fach		+			+				0			
	2	225-fach		+			0							
	3	225-fach	45	+			+				0			
	II 1	unverdünnt	8	+				+	+			+		
	2	unverdünnt		+				+	(+)			0		
	3	30-fach	10 (40)	+				+	+			+		
	4	30-fach		+			?	0				<		
	III 1	unverdünnt	15	0		0		0			0	0	0	0
	2	unverdünnt		+				fast 0						
	3	30-fach	10 (35)	+			$\frac{3}{5}+$				(+)*		< +++	+++
	4	30-fach		+	+		0							
	IV 1	unverdünnt	12	+	+	+			$\frac{1}{2}+$			(+)*		
	2	20-fach	12	+	+	+			0			0	0	
	3	unverdünnt	50	+	+	+			+	$\frac{2}{3}+$		(+)*		
	4	20-fach	50	+	+	+			(+)	(+)		0		
	5	unverdünnt		+	0									
				+										

Für die in vorstehender Tabelle wiedergegebenen Beobachtungen habe ich mich der Recklinghausenschen oder Geißlerschen Gaskammer bedient, deren Form ich als bekannt voraussetzen darf. Die breiten Seiten derselben waren in der Mitte einander soweit genähert, daß sie einen größeren Flüssigkeitstropfen gut festhielten, aber bei ruckweisem Schütteln völlig wieder ablaufen ließen. Ich konnte so die meiste Zeit über die Luft auf eine große Oberfläche wirken lassen und brauchte nur zum Zweck der mikroskopischen Untersuchung den Tropfen in den engen mittleren Teil der Kammer zu bringen.

Da die Kammern völlig aus Glas bestehen, konnte ich sie bei 150° sterilisieren. Die Ableitungsröhren wurden mit Wattestopfen verschlossen. Die Impfung nahm ich mit sterilisierten Kapillarpipetten vor. Es ist mir so gelungen, Infektionen mit fremden Keimen, die gerade bei diesen Versuchen sehr störend und irreführend sein können, zu vermeiden. Sollte die Luft aus der Kammer entfernt werden, so wurden an die Ableitungsröhren nach der Impfung mittels guten Kautschukschlauchs zwei Glasröhren angeschlossen, die eine meist zugeschmolzen, die andere, die mit der Luftpumpe verbunden wurde, in der Mitte ausgezogen. An dieser Stelle wurde nach dreimaligem Evakuieren und Einleiten von Wasserstoff abgeschmolzen und die Kammer fernerhin bei 31° unter Wasser gehalten. Es ist für den Erfolg sehr wichtig, daß die Schlauchstücke kurz vor ihrer Verwendung einige Zeit ($\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde) in Wasser ausgekocht werden.

Die Vorkulturen setzte ich stets in Bouillon mit 0,04 Proz. Indigkarmin an. Durch die Entfärbung wurde die Abwesenheit von freiem Sauerstoff angezeigt. Vor dem Öffnen dieser Kulturen untersuchte ich den Bewegungszustand des Materials und zwar wegen der aufsteigenden Gasblasen bei schräg gestelltem Röhrchen mit umgelegten Mikroskop. Eine 32-kerzige Metallfadenlampe diente dazu als Lichtquelle. In der Nähe der Wand des Reagensgläschens ist stets eine strömungsfreie Zone vorhanden, in der man die Eigenbewegung beobachten kann. Ein Objektiv mit starker Vergrößerung und großem Objektstand ist natürlich notwendig. Ich benutzte Wasserimmersion D* von Zeiß.

In der Tabelle V sind die auf diese Weise gewonnenen Resultate zusammengestellt. Folgende Abkürzungen habe ich dabei verwendet: +++ = sehr gute Bewegung; ++ = gute Bewegung; + = Bewegung vorhanden; + (+) = fast alle Stäbchen beweglich; (+) = nur wenige Stäbchen beweglich; $\frac{1}{2}$ +, $\frac{1}{3}$ + = die Hälfte oder ein Drittel der Stäbchen ist beweglich; 0 = keine Bewegung; < = Vermehrung; << = starke Vermehrung; < 1 $\frac{1}{2}$ = Vermehrung auf das Anderthalbfache; * = j u n g e, gut bewegliche Stäbchen vorhanden.

Jede wagerechte Reihe gibt die Beobachtungen an einer Gaskammer wieder. Die Gaskammern, für die in der 4. Rubrik (Dauer der Lufteinwirkung bis zur Evakuierung) nichts verzeichnet ist, blieben dauernd offen mit der Luft in Berührung. Andernfalls bedeuten die Zahlen die Zeit der Lufteinwirkung in Minuten von Herstellung des Hängetropfens bis zur ersten Evakuierung, die eingeklammerten die Zeit vom Öffnen der Vorkultur bis zur Evakuierung.

Vgl. Tabelle V.

Das Verhalten meiner Anaeroben ist zweifellos interessant. Ich verweise nur auf die Versuche III₁ und VIII₃. Um Einzelheiten zu erklären, wären aber sehr viel umfassendere systematisch durchgeführte Untersuchungen notwendig. Ich beschränke mich daher auf einige Punkte hinzuweisen. Zunächst

zeigt sich wieder deutlich der Einfluß der Verdünnung. Aber auch bei sehr weitgehender Verdünnung wird die Dauer der Bewegung relativ wenig reduziert, was ich darauf zurückführen möchte, daß auch das unverdünnte Material bei dem verwendeten geringen Flüssigkeitsquantum und der großen Oberfläche, die es der Luft bietet, der Einwirkung des Sauerstoffs fast ebenso ausgesetzt ist, wie das verdünnte Material.

Die Dauer der Bewegung an Luft ist abgesehen von Versuch VIII, bei dem *Bac. amylobacter* ein mir unerklärliches abnormes Verhalten zeigt, ziemlich lang, 2—5 und mehr Stunden, auch bei einer Verdünnung des Materials, die der in den Versuchen der Tabellen II—IV gleich oder nahe kommt, während dort die Tötungszeit zumeist sehr viel kürzer gefunden wurde. Dieser Widerspruch scheint sich jedoch dadurch erklären zu lassen, daß auch bei fortdauernder Bewegung die Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit schon verloren sein kann. Wie sollen wir sonst erklären, daß nach kurzer Sauerstoffeinwirkung die Vegetativen sich unter Wasserstoff noch eine zeitlang bewegen, dann aber zur Ruhe kommen, ohne sich zu vermehren, während zweifellos Wachstumsbedingungen vorhanden sind?

B. Die Sporen.

1. Verhalten der Sporen bei Einwirkung des Sauerstoffes der Luft.

Die Resultate der in den Tabellen VI bis VIII zusammengestellten Versuche sind in gleicher Weise gewonnen, wie die der Tabellen II bis IV. Sie unterscheiden sich von ihnen nur dadurch, daß schon bei der mikroskopischen Untersuchung das Vorhandensein von reifen Sporen festgestellt werden konnte.

In diesen Versuchen wird das Verhalten des erhitzten Materials von besonderer Bedeutung sein. Wir müssen bei *Paraplectrum foetidum* und *Bac. botulinus* damit rechnen, daß in den nicht erhitzten Kulturen auch Vegetative zur Entwicklung kommen. Wir werden das dann annehmen müssen, wenn das erhitzte Material sich sehr viel resistenter erweist als das nicht erhitzte. Da durch das Erhitzen, — welches nie ganz gleichmäßig von statten gehen kann wegen der verschiedenen Wandstärke und Form der Erlenmeyerkölbchen —, in einem Falle auch vegetative Zustände noch am Leben bleiben (s. Versuch 5, Tabelle II), in einem anderen dagegen schon reife Sporen getötet werden dürften, so ist das Verhältnis, in dem die Kolonienzahlen des jeweils ersten Plattenpaares eines Versuches zueinander stehen, nicht dem Verhältnis von Sporen + Vegetativen zu Sporen gleich zu setzen.

Sind überhaupt nur gleichwertige Entwicklungsstadien zur Entwicklung gekommen, so werden sie bei verschiedenen langer Lufteinwirkung prozentual gleichviel Kolonien bilden. Dieser Fall wird jedoch stets nur mit Annäherung eintreten, da auch die reifen Sporen Unterschiede in ihrer Resistenz gegen Erhitzung und Sauerstoffeinwirkung aufweisen werden.

Vgl. Tab. VI—VIII.

Am einfachsten liegen die Verhältnisse bei *Bac. amylobacter* (Tabelle VIII). Diese Versuche bestätigen zunächst die frühere Erfahrung, daß die Vegetativen zur Kolonienbildung schon nach sehr kurzer Lufteinwirkung nicht mehr fähig sind. Das geht daraus hervor, daß auf den erhitzten Platten fast gleichkräftiges Wachstum eintrat, wie auf den nicht-erhitzten und daß das Verhältnis der Kolonienzahlen dieser Platten untereinander auch bei längerer Lufteinwirkung ziemlich konstant blieb.

Tabelle VI.
Paraplectrum foetidum.

No. des Versuchs.	Mikroskopischer Befund	10—60 Minuten an Luft	1—5 Std.	1 Tag	2—3 Tage	4—6 Tage	7—8 Tage	10 Tage	14—18 Tage	länger	Alter der Vorkultur
29	wenig Sporen	850 (0)		90 (1 K.)							5
30	reife Sporen vereinzelt	650 (0)							0.15 (0)		3
31	viel ältere Formen	1400 (45)	100 —								4
32	fortgeschrittene Sporenbildung	141		10		0.7					2
33	Sporen: Veget. 1 : 10	1164 (664)			101 (76.3)					3.5 (1)	4
34	reife Sporen und Sporenträger	1300 (0)		105 (3 K.)	58.3 (6 K.)						4
35	viel Sporen	2300 (252)					520 (3000)		(600)	26.1 (160)	5
36	ebenso	20 000 (23)			100 (150)	100 (120)					3
37	ebenso	30 000 (180)			116 (83)						4
38	viel reife Sporen und junge Formen	20 000 (610)				22 (106)					2
39	viel Sporen und sehr viel Stäbch.	16 000 (2900)					1.17 (5.6)				4
40	viel reife Sporen	45 000 (3800)				(110)					2
41	ebenso	23 000 (9000)					4.8 (15.5)				2
42a	sehr viel Sporen	22 000 (9000)					0.8 (1.2)				7
42b	ebenso	90 000 (27 000)					2.3 (7.4)				7
43	ebenso	40 000 (14 000)		70.5 (100)		32.5 (14)					5
44	Fast nur Sporen	57 000 (50 000)				3 (3.4)					17
45	ebenso	20 000 (11 000)			225 (350)		120 (163)	(159)	36.3	0	11

Erklärung der Tabellen VI—VIII siehe p. 12.

Eine Eigentümlichkeit tritt besonders scharf hervor, die uns schon einmal begegnet ist (Versuche 25, Tabelle IV und I₂, p. 16). Während auf dem ersten Plattenpaar, das nach sehr kurzer Lufteinwirkung unter Wachstumsbedingungen gebracht wurde, keine Kolonien sich bildeten, geschah das überraschender Weise, wenn die Platten einige Stunden oder Tage an Luft gestanden hatten (Versuche 63, 64), aber auch wenn auf den ersten Platten Wachstum eintrat, war in den meisten Fällen bei längerer Lufteinwirkung

Tabelle VII.
Bacillus botulinus.

No. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—60 Minuten an Luft	1 Tag	2—3 Tage	4—6 Tage	7—8 Tage	9—10 Tage	14 Tage	97 Tage	Alter der Vorkultur
46a	sehr wenig Sporen sonst ganz jung	1300 (100)		92 (500)		17 (240)				1
46b		236 (80)		98 —		26 (102)				
46c		34		112		26				
47	meists Vegetative	45 000 (485)				26.7 (160)				2
48	reife Sporen selten	100 000 (1100)			0.65 —					3
49	wenig reife Sporen	16 000 (2900)				1.16 (5.6)				2
50	viel Sporenträger	1200 (4)		43 (0)	42 (1 K.)					4
51	Sporen: Vegetat. 1 : 15	7000 (385)				9.3 —				4
52	viel reife Sporen meist Vegetative	35 000 (4)		72						10
53	viel Sporen	45 000 (270)			100 —					2
54	viel reife und fast reife Sporen	5000 (900)						inf. (66)		3
55	ebenso	19 000 (3200)		26 (75)						10
56	viel reife Sporen	55 000 (1100)			14.5 (82)					4
57	fast nur Sporen	60 000 (12 000)			33 inf.					12
58	ca. $\frac{1}{2}$ Sporen	25 000 (7000)			10 (29)					11
59	viel reife Sporen	70 000 (9000)	69 (78)							3 Pl. ¹⁾
60	ebenso	24 000 (9000)			42 (19)					2
61	fast nur reife Sporen	18 000 (12 000)		66 (75)		11 (22)	11 —	4.6 (7)	0 (0)	13
62	viel Sporen	36 000 (36 000)		400 (280)						3

eine Zunahme der Kolonienzahl zu konstatieren (Versuche 66—69 und 71—73).

Es liegt der Gedanke nahe, daß hierbei die Wirkung der Temperatur des flüssigen Agars oder — bei den erhitzten Kulturen — des siedenden Wassers in Frage käme. Da die Platten nacheinander gegossen wurden, dauerte die Temperaturerhöhung, der die Sporen ausgesetzt wurden, ver-

¹⁾ Siehe Anm. Tabelle IV.

Tabelle VIII.
Bacillus amylobacter.

Nr. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—30 Minuten an Luft	35—60 Minuten	1—2 Stdn.	3—5 Stdn.	2—3 Tage	8—12 Tage	19 Tage	Alter der Vor-kultur
63	viel Sporen-träger	0 (0)		0 (0)	44k (57k)				6 Pl.
64	wenig reife Sporen	0 (0)					25k (5k)		2
65	sehr wenig reife Spor.	1000 (284)						0.55 (3,3)	3
66	ebenso		78 (24)				51,3 117		5
67	Sporen: Vegetat. 1:10	353 (270)			105,7 (127)	158,5 (190)			3
68	viel Sporen-träger		1100 (500)		46 (100)				4
69	fast nur Sporentr.		116 (89)	191 (160)	313 (317)				3
70	reichlich Sporen	212 (66)					90 (91)		5
71	ebenso		93 (133)	75 (53)	275 (168)				3
	viel Sporen	606 (495)		136 (115)	64 (62)				3
73	ebenso	1185 (425)				102 (106)			4

schieden lange. Bei den Versuchen 63, 67—69 und 72—73 wurden die zuerst gegossenen Platten auch zuerst unter die Glocke zur Evakuierung gebracht, bei den Versuchen 64—66 zuletzt. Das spricht sowohl gegen einen schädigenden, wie einen fördernden Einfluß der Temperaturerhöhung.

Wir müssen also, da sonst die Bedingungen für alle Platten die gleichen waren, an eine Wirkung des Sauerstoffes denken, in dem Sinne, daß ein Verweilen an Luft für 2—3 Tage fördernd, bei längerer Dauer schädigend wirkt. Dagegen ist es unwahrscheinlich, daß der Sauerstoff bei kürzester Wirkungs-dauer (bei den ersten Platten) einen direkt schädigenden Einfluß auf die vorhandenen Sporen ausübe. Es wäre allerdings daran zu denken, daß durch stufenweise Oxydation eines in der Spore vorhandenen autoxydablen Stoffes erst eine giftige entwicklungshemmende, später eine ungiftige Verbindung entstände. Auf eine andere Erklärungsmöglichkeit werde ich auf Seite 30 eingehen.

Ich möchte noch besonders auf die auffällige Tatsache hinweisen, daß die Zahl der Kolonien bei *Bacillus amylobacter* stets sehr klein ist, gleichgültig, ob viel oder wenig Sporen im Material vorhanden sind. Ich führe das auf die Fähigkeit des *Bacillus amylobacter* zurück, bei der Sporenbildung reichlich Schleim zu produzieren, was beim Abimpfen und Herstellen von Präparaten recht störend sich kund gab. Es ist danach verständlich, wenn bei älterem Material selbst nach starkem Schütteln 20 und mehr Individuen zusammenbleiben und eine Kolonie bilden, während bei einem Material,

das nur wenige Prozent Sporen enthält, die Wahrscheinlichkeit gering ist, daß eine Kolonie mehreren Sporen ihren Ursprung verdankt. Die Versuche 73 und 67 zeigen dies Verhalten in typischer Weise. Bei dem einen besteht die Hälfte des Materials aus Sporen, es wurden pro Platte ca. 50 000 Keime geimpft und es entstehen etwa 1200 Kolonien, d. h. $\frac{1}{20}$ der zu erwartenden. Bei Versuch 67 ist nur etwa 1 Proz. Sporen vorhanden. Die Impfung bringt mehr als 85 000 Keime auf die Platte und es entstehen 350 Kolonien, also mehr als zu erwarten waren. Dieser Mehrbetrag ist auf zufällig sich summierende Fehler der Zählungen und Berechnungen zurückzuführen.

Gerade in dieser Beziehung verhalten sich *Paraplectrum foetidum* und *Bac. botulinus* ganz anders. Je nach der Menge der vorhandenen Sporen variiert die Kolonienzahl von wenigen Hundert bis zu vielen Tausend. Wir sehen schon hieraus wiederum, daß die vegetativen Stadien auch bei diesen Bazillen an der Kolonienbildung nicht oder nur wenig beteiligt sind.

Die Resistenz der Sporen von *Paraplectrum foetidum* bei Luftwirkung ist sehr verschieden. Nach 2—3 Tagen, meist auch nach 4—6 Tagen, merkt man noch keine deutliche Abnahme der Kolonienzahl, die nach 7—8 Tagen jedoch scharf hervortritt. Auch bei den wenigen Versuchen, bei denen zunächst ein Anstieg der Kolonienzahl zu verzeichnen war, müssen wir auf den 6. bis 8. Tag den Beginn des Absterbens der Sporen verlegen, wie es Versuch 45 deutlich zeigt. Die Prozentzahlen in den Versuchen 35 und 45 dürfen wir selbstverständlich nicht mit denen der übrigen vergleichen, da ja offensichtlich auf den ersten Plattenpaaren nur ein Teil der Sporen ausgekeimt ist. Darnach sind in den Versuchen 33 und 35 nach drei Wochen noch 3 bis 5 Proz. der Sporen keimungsfähig, nach 92 Tagen ist alles getötet (Versuch 45). In anderen Fällen ist schon nach 4—6 Tagen (Versuch 44) oder 6 bis 8 Tagen (Versuche 39, 41, 42) die Zahl der keimfähigen Sporen bis auf wenige Prozent reduziert, ohne daß die Anwesenheit von Vegetativen dafür verantwortlich gemacht werden könnte. Diese starken Unterschiede in der Resistenz sind wohl auf das Alter der Vorkulturen zurückzuführen. Es entspricht bisherigen Erfahrungen, daß die Sporen nach einer bestimmten Zeit eine maximale Resistenz erreichen und dann wieder empfindlicher werden. Dieses Maximum der Widerstandsfähigkeit wird in unserem Falle bei 4—5-tägiger Vorkultur erreicht sein. (Versuche 35 und 43).

Bei *Paraplectrum foetidum* brauchen wir nun in keinem Fall eine Beteiligung der vegetativen Formen an der Kolonienbildung zur Erklärung der Resultate heranzuziehen. Bei *Bac. botulinus* dagegen steht es wenigstens für einen Versuch sicher, daß die vegetativen Zustände zur Bildung von Kolonien beigetragen haben. Bei Versuch 48 wurden in der nicht erhitzten Kultur 100 000 Kolonien, in der erhitzten 1100 gebildet. Das Material war sehr sporenarm, nach meiner Berechnung wurden pro Platte höchstens 3500 Sporen geimpft. Nach 5 Tagen Luftzutritts sind noch 650 Kolonien zur Entwicklung gekommen, d. h. 18,4 Proz. der mutmaßlich vorhandenen Sporen. Dieser Wert stimmt recht gut überein mit dem auch sonst nach 4—8tägiger Einwirkung der Luft gefundenen.

Die Abnahme der Kolonienzahl beginnt einigemale erst nach dem zweiten (Versuch 46) oder vierten Tage (Versuch 53). In der Mehrzahl der Versuche nimmt die Zahl der Kolonien scheinbar von Anfang an stetig ab und zwar bis 20 Proz. schneller als weiterhin (s. Versuch 61). Es dürfte sich hierbei nicht um den Einfluß von vegetativen Stadien handeln, da sporenarmes

Material nicht etwa eine schnellere Abnahme der Kolonienzahl zeigt, als sporenreiches, sondern um individuelle Differenzen unter den morphologisch als Sporen charakterisierten Entwicklungsstadien. Wir müssen ja neben der morphologischen Differenzierung der Sporen noch eine physiologische Entwicklung, sozusagen ein Ausschalten der Lebenstätigkeit annehmen. Jedenfalls darf ich es als eine spezifische Eigentümlichkeit des *Bac. botulinus* hinstellen, daß bei ihm der Übergang von empfindlichen Entwicklungsstadien zu resistenten sehr allmählich von statten geht im Gegensatz zu *Paraplectrum foetidum* und besonders *Bac. amylobacter*.

Der fördernde Einfluß des Luftsauerstoffes (s. o.) tritt bei *Paraplectrum foetidum* und *Bac. botulinus* zu selten hervor um sichere Anhaltspunkte zu geben. Interessant ist der hierhergehörige Versuch 62 (Tab. VII) bei dem auf den ersten Platten gruppenmäßiges Wachstum stattgefunden hat. 20—30 große Kolonien waren von nach außen immer kleiner und zahlreicher werdenden umgeben. Der Grund für dieses Verhalten liegt offenbar in der verschieden langen Zeit bis zum Beginn der Keimung der einzelnen Sporen. Die großen Kolonien begannen zuerst sich zu entwickeln und hemmten durch ihre Stoffwechselprodukte zunächst ihre Umgebung, so daß dort auch nur die am schnellsten keimenden Sporen zur Kolonienbildung führten. Weiter nach außen verliert sich schließlich diese hemmende Wirkung.

Dieser Versuch gibt uns einen wertvollen Hinweis darauf, daß vorübergehende Sauerstoffeinwirkung dadurch die Zahl der Kolonien erhöhen mag, daß sie die Keimung träge keimender Sporen beschleunigt. Die Trägheit der Keimung kann einmal rein physikalische Gründe haben (Dicke, Quellbarkeit der Sporenmembran). Da die Quellung bekanntermaßen unabhängig vom Sauerstoff erfolgt und auch die weitere Keimung bei Anwesenheit des Sauerstoffes nur stark gehemmt nicht völlig verhindert werden dürfte (s. p. 33), so läßt es sich erklären, daß Luftwirkung von bestimmter Dauer Differenzen in der Keimungsgeschwindigkeit ausgleichen kann, wobei der Sauerstoff nur als entwicklungshemmender Faktor in Frage kommt. Er gestattet eben die Keimung aller Sporen nur bis zu einer gewissen Grenze, die von den träge keimenden etwas später erreicht wird als von den übrigen.

Dies könnte jedoch nicht erklären, weshalb sich bei einigen Versuchen mit *Bac. amylobacter* auf den der Luft am kürzesten exponierten Platten überhaupt keine Kolonien bildeten. Der Gedanke, daß vorübergehende Sauerstoffeinwirkung als Reiz bei der Sporenbildung oder -Keimung notwendig sei, wurde schon durch den Versuch II₂, p. 19 als unrichtig erwiesen. Dem widerspricht auch ein Umstand, den ich bisher nicht erwähnte, nämlich der, daß die steril gebliebenen Platten kein Wachstum zeigten, auch wenn sie 6 Tage unter Wasserstoff gestanden hatten, dann an Luft und endlich wieder unter die Glocke gebracht wurden. Eine allerdings etwas gezwungene Erklärung für das rätselhafte Verhalten des *Bac. amylobacter* läßt sich geben, wenn wir annehmen, daß bei den hier betrachteten Versuchen das Material nur unvollkommen reife Sporen enthalten habe, die nach der Übertragung in frischen Nähragar und Entfernung der Luft zwar gute Keimungs-, jedoch keine Sporenbildungsbedingungen vorfanden, die also infolge ihres unreifen Zustandes nicht auszukeimen, wegen der Außenbedingungen aber auch nicht weiter zu reifen vermochten. — Der Sauerstoff dagegen würde die Sporenbildung begünstigen, wie das schon 1881 von Praz-

m o w s k i¹⁾ angegeben und später von M a t z u s c h i t a²⁾ bestätigt wurde. Die unreifen Sporen würden sich also an Luft weiter entwickeln und könnten dann in Wasserstoff auskeimen. Dieser Deutungsversuch setzt jedoch die Vorstellung voraus, daß der Prozeß der Sporenbildung erst bis zu einem bestimmten Reifestadium vorgeschritten sein muß, ehe eine Auskeimung erfolgen kann.

Ein sicherer Entscheid über den Modus der fördernden Wirkung des Sauerstoffes läßt sich nach den vorliegenden Versuchen nicht geben, vielleicht ist die Sporenkeimung in verschiedener Weise vom Sauerstoff beeinflussbar.

Eine Weiterentwicklung von Stäbchen zu Sporen habe ich bei allen drei Arten unter streng aeroben Bedingungen nicht wahrnehmen können; das bringt jedoch weder für noch gegen die Annahme den Beweis, daß vorgeschrittene Sporenstadien an Luft zu reifen Sporen werden können.

2. Verhalten der Sporen bei verminderter Sauerstoffpartiärpressung.

Die Versuche des letzten Abschnittes bringen nicht den Beweis, daß der Sauerstoff an der schnellen Vernichtung der Sporen wesentlich beteiligt ist. Die Platten, die zuerst dem Einfluß des Sauerstoffes entzogen wurden, bieten gegenüber den anderen keine vollwertige Kontrolle, da ja in dem Moment, in dem der Sauerstoff entfernt ist, Wachstumsbedingungen eintreten, die bei Zutritt von Luft nicht vorliegen. Das Keimen der Sporen im Vakuum zu verhindern, wäre auf verschiedene Weise möglich gewesen, durch Herabsetzen der Temperatur bis unter das Minimum oder durch nachträgliche Zugabe der Nährstoffe. Am freiesten von fremden unkontrollierbaren Einflüssen ist die Wirkung des Sauerstoffes durch Änderung seines Partiärdruckes zu studieren.

Ich habe in Tabelle IX die Versuche dieser Art zusammengestellt. Das erste Plattenpaar wurde stets möglichst schnell in Wasserstoffatmosphäre gebracht, dann eine Glocke mit dem zweiten Plattenpaar bis zu einem geringen Drucke ausgepumpt und Wasserstoff eingeleitet. Das dritte Paar blieb an Luft. Alle Kulturen wurden bei gleicher Temperatur (31°) gehalten.

Bezüglich der Anordnung der Tabelle vergleiche p. 12. Die geringen Abweichungen bedürfen keiner Erläuterung.

Vgl. Tab. IX.

Bei 5 mm Luftdruck erfolgte bei *Paraplectrum foetidum* und *Bac. botulinus* Wachstum, bei 20 mm nicht.

In allen Versuchen ist zwischen den Kulturen, die bei verschiedenen wachstumshindernden Sauerstoffpartiärdrucken gehalten wurden, ein deutlicher Unterschied in der Kolonienzahl zu bemerken, aber während dieselbe bei *Paraplectrum foetidum* unter geringerem Sauerstoffdrucke stets größer ist als bei höherem, ist das bei *Bac. botulinus* nicht der Fall. (Versuch 47, 56). Dieses Verhalten ist sehr merkwürdig und veranlaßte mich zunächst, die vorliegenden Versuche überhaupt sehr skeptisch zu betrachten. Tatsächlich ist, abgesehen von der gewünschten noch eine Bedingungsungleichheit bei dem zweiten und dritten Plattenpaar vorhanden. Nachdem nämlich die einen Kulturen bei vermindertem Sauerstoffdruck gestanden hatten, wurden sie

¹⁾ P r a z m o w s k i, Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten. [Dissert.] Leipzig (H. Voigt), p. 28. 33.

²⁾ M a t z u s c h i t a, T e i s i, Zur Physiologie der Sporenbildung der Bakterien usw. (Arch. f. Hyg. Bd. 43. 1902. p. 317.)

Tabelle IX.

No.	Spezies	10—60 Minuten	2—3 Tage	4—6 Tage	7—10 Tage	Partiärdruck der Luft
47	<i>Bacillus botulinus</i>	45 000 (485)			26,7 (160) 5,5 (119)	1 Atm. 40 mm
56	„ „	55 000 (1100)		14,5 (82) 3,8 (55)		1 Atm. 20 mm
48 ²⁾	„ „	100 000 (1100)		0,65 (—) 0,85 (77,3)		1 Atm. 40 mm
58	„ „	25 000 (7000)		10 (29) 100 ¹⁾ (86) ¹⁾		1 Atm. 5 mm
55	„ „	19 000 (3200)	26 (75) 37 (100)			1 Atm. 25 mm
38	<i>Paraplectrum foeti.</i>	20 000 (610)		22 (106) 100 (2000)		1 Atm. 40 mm
40	„ „	45 000 (3800)		— (110) 9 (126)		1 Atm. 20 mm
42b	„ „	90 000 (27 000)			2,3 (7,4) 6,1 (27,5)	1 Atm. 500 mm
42a	„ „	22 000 (9000)			0,8 (2,2) 1,9 (6,3)	1 Atm. 500 mm
44	„ „	57 000 (50 000)		3 (3,4) 142 ¹⁾ (90) ¹⁾		1 Atm. 5 mm

auf kurze Zeit an Luft gebracht, damit sie mit den dauernd dem Luftzutritt ausgesetzten Kulturen unter einer Glocke evakuiert werden konnten.

Es widerspricht indes vollkommen dem im letzten Kapitel gemachten Erfahrungen, daß eine kurze 10 Minuten selten überschreitende Sauerstoffeinwirkung Sporen zu töten imstande sei. Der Annahme, daß der Wasserstoff schädlich eingewirkt hätte, widersprechen die umgekehrten Resultate der übrigen Versuche, bei denen der Wasserstoff in gleicher Weise erzeugt wurde.

¹⁾ Bei 5 mm Luftdruck erfolgte Wachstum; das Maximum des Sauerstoffpartiärdruckes liegt also über 1 mm und unter 4 mm.

²⁾ S. p. 29.

Das Widersprechende meiner Resultate wird sich am ehesten aufklären lassen, wenn wir eine kurze Betrachtung aufstellen, unter welchen Bedingungen der Sauerstoff überhaupt auf einen Organismus einwirken kann. Inaktiver Sauerstoff vermag weder mit Eiweiß noch mit dessen Bausteinen in Reaktion zu treten, es ist dazu stets ein Stoffwechselvorgang notwendig, in den der Sauerstoff störend oder fördernd eingreifen kann. Nun ist aber in allen bisher beschriebenen Versuchen der Sauerstoff der einzige die Keimung hindernde Faktor. Alle übrigen Wachstumsbedingungen sind vorhanden. Nun dürfen wir kaum annehmen, daß der Sauerstoff lediglich durch seine Gegenwart den Beginn der Stoffwechselvorgänge verhindern könne, die unter anaëroben Bedingungen zur Keimung der Sporen und zur Vermehrung führen. Aber selbst, wenn wir den Sauerstoff als einen negativen Katalysator gelten lassen wollen, geben wir damit zugleich zu, daß der durch ihn verzögerte chemische Vorgang auch sonst nur wesentlich schneller stattfindet und — vice versa — daß die Keimung auch bei Sauerstoff zutritt, wenn auch sehr verzögert erfolgt. Mit dem Auftreten der ersten Stoffwechselvorgänge würde dann der Sauerstoff entsprechend seiner chemischen Individualität in Aktion treten. Da aber die Wirkung der Katalysatoren innerhalb gewisser Grenzen der Menge derselben proportional ist, wird bei Verringerung des Sauerstoffdruckes relativ eine Beschleunigung des Stoffwechsels eintreten und damit müßte die Keimkraft bei geringerem Sauerstoffdruck stets schneller erschöpft sein als bei höherem. Das trifft nun im allgemeinen nicht zu.

Stellen wir uns auf den Boden der Theorie, daß der Stoffwechsel primär unabhängig vom Sauerstoff erfolgt, so müssen wir annehmen, daß der Prozeß der Keimung — von Quellung sehe ich hier ganz ab — zunächst in gleicher Weise einsetzt bei Luftzutritt wie beim Fehlen von Sauerstoff unter sonst gleichen Bedingungen, daß dann der Sauerstoff aktiv störend und zerstörend eingreift.

Unterhalb des Maximums ist der Sauerstoff nicht imstande, Keimung und Vermehrung dauernd zu verhindern. Oberhalb des Maximums wird mit der Sauerstoffkonzentration die hemmende und schädigende Wirkung höchstens bis zu einer Grenze proportional zunehmen, wenn wir als Bedingung einer Wirkung des Sauerstoffes die Einleitung der Stoffwechselvorgänge ansehen. Dadurch läßt sich zunächst in befriedigender Weise erklären, weshalb die Wirkung eines hohen Sauerstoffdruckes so unwesentlich verschieden ist von der eines 20 bis 40 mal geringeren.

Bisher haben wir nur die supra- und submaximalen Sauerstoffkonzentrationen berücksichtigt. Wie steht es nun mit dem Maximum selbst? Das „Gleichgewicht“ zwischen der „Keimkraft“ und der hemmenden „Kraft“ des Sauerstoffes, das wir nach den bisher gemachten Voraussetzungen beim Maximum annehmen müssen, kann nur ein labiles sein, da ja der Sauerstoff dauernd verbraucht wird.¹⁾ Es wird daher nun die Geschwindigkeit der Sauerstoffzufuhr ausschlaggebend sein, ob eine Auskeimung und Weiterentwicklung erfolgt oder nicht. Die Vorstellung ist jedenfalls erlaubt, daß gerade dieser Wechsel der nur vom Sauerstoff abhängigen Keimungsbedingungen besonders deletär wirkt, so daß eine Erschöpfung eher erreicht wird, als bei höherem dauernd hemmenden Sauerstoffdrucke. Damit ließe sich das Verhalten des *Bac. botulinus* erklären.

Ich war früher der Ansicht, daß bei geringem Sauerstoffdruck die Sporen

¹⁾ Chudislow, l. c. 1898. p. 389.

zwar völlig auskeimen könnten und daß dann nachträglich die jungen vegetativen Keime getötet würden. Abgesehen davon, daß ich in Gaskammerkulturen auch bei vermindertem Luftdruck keine Sporenkeimung konstatieren konnte, halte ich sie auch für unwahrscheinlich, da sie eine qualitative Änderung des Stoffwechsels mit dem Auskeimen voraussetzt.

3. Verhalten der Sporen bei vollem Luftzutritt und verschiedener Temperatur.

Die wesentliche Forderung des letzten Kapitels war es, daß eine schädliche Wirkung des Sauerstoffes den Beginn der Keimung in seiner Gegenwart voraussetzt, daß also, wenn ich so sagen darf, die guten Wachstumsbedingungen die Ursache des so überraschend schnellen Verlustes der Keimfähigkeit darstellten. Ich habe deshalb einige Versuche angestellt, bei denen ich durch Temperaturerniedrigung die Wachstumsbedingungen wesentlich verschlechterte.

Diese Versuche sind in der folgenden Tabelle X zusammengestellt, deren Anordnung der der Tabelle IX entspricht.

Die Resultate entsprechen ganz den Erwartungen. In den ersten Tagen, während deren auch bei optimaler Temperatur keine wesentliche Abnahme der keimfähigen Sporen erfolgt, ist ein Unterschied zwischen den kalt und warm gehaltenen Kulturen zweifelhaft. Nach 7—10 Tagen wird er jedoch in allen Fällen sehr deutlich, besonders bei *Paraplectrum foetidum* und *Bac. botulinus*. Die geringeren Differenzen bei *Bac. amylobacter* sind wohl auf die allgemein größere Resistenz seiner Sporen zurückzuführen. Zur Deutung der Resultate möchte ich nur das eine noch hinzufügen, daß durch die Erhöhung der Temperatur über das Minimum derselben nicht nur der Stoffwechsel beschleunigt wird und damit dem Sauerstoff mehr Angriffsmöglichkeiten geboten werden, sondern daß allgemein die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird, so daß der Sauerstoff auch aus diesem Grunde schädlicher wirken kann als bei niedriger Temperatur.

Im Anschluß hieran erwähne ich einige Versuche, die mir zeigen sollten, wie groß etwa die maximale Lebensdauer der Sporen bei Luftzutritt sei, wenn ihnen keine Keimungsbedingungen geboten werden. Ich sammelte im Laufe meiner Untersuchungen eine Anzahl gut bewachsener Agarkulturen an, die ich an Luft stehen und allmählich eintrocknen ließ. Die Sporen waren also durch ihre eigenen Stoffwechselprodukte und aus Nährstoffmangel am Auskeimen gehindert. Die Temperatur, bei denen ich sie aufbewahrte, betrug etwa 20° C. Von derartigem, verschieden altem Material wurden nunmehr Bouillonkulturen angesetzt. Die Impfung war stets sehr reichlich. Die Kulturen einer Spezies wurden zu besserem Vergleich unter einer Glocke evakuiert zusammen mit einem Kontrollröhrchen, das mit jungem Sporenmaterial geimpft war. Die Bouillon war mit Indigkarmin versetzt, so daß der Beginn des Wachstums leicht zu erkennen war an der beginnenden Entfärbung.

Bei den drei untersuchten Arten keimte 80 bis 500 Tage altes Material in ungefähr der gleichen Zeit und das Wachstum schritt ungefähr gleichmäßig schnell fort. Nach 1½ Jahren ist also die Grenze der Lebensdauer noch nicht erreicht. Zum Vergleich führe ich einige ältere Angaben darüber an. Chudiakow¹⁾ fand die Sporen von *Bacterium butyricum*

¹⁾ Chudiakow, l. c. 1898. p. 391.

Tabelle X.

Nr.	Spezies	10—60 Minuten	2—4 Tage	7—10 Tage	14 Tage	Temperatur
74	<i>Paraplect. foetidum</i>	800 (0)	0 (0)			31° C
			50 (0)			18° C
37	„ „	30 000 (180)	116 (195)			31° C
			83 (200)			18° C
39	„ „	16 000 (2900)		1,17 5,6)		31° C
				62,5 (62,0)		4° C
41	„ „	23 000 (9000)		4,8 (15,5)		31° C
				62 (90)		4° C
2a	„ „	150 (40)			1,3 (0)	31° C
					170 (375)	4° C
2b	„ „	1500 (550)			2,7 (7,0)	31° C
					173 (255)	4° C
62	<i>Bacillus botulinus</i>	36 000 (36 000)	400 (280)			31 ° C
			300 (47)			4° C
53	„ „	45 000 (270)	100 —			31 °C
			111 (174)			4° C
49	„ „	16 000 (2900)		1,16 (5,6)		31° C
				61,3 (62,0)		4° C
64	<i>Bacillus amylobact.</i>	0 (0)		25K. (5K.)		31° C
				81K. (8K.)		4° C
65	„ „	1000 (284)			0,5 (1,76)	31° C
					3,3 (2,1)	4° C
66	„ „	78 (24)		51,3 (117)		31° C
				73 (87,5)		4° C

bei Bruttemperatur an Luft nach 230 Tagen tot, bei Zimmertemperatur nach 260 Tagen noch lebend.

3*

v. Hibler¹⁾ gibt an, daß *Bac. tetani* trocken in zugeschmolzenen Röhrchen, also anaërob aufbewahrt, noch nach 3 Jahren keimfähig geblieben war.

Zusammenfassung.

An der Hand der Tabellen habe ich die Resultate dieser Arbeit schon diskutiert; ich möchte an dieser Stelle daher nur kurz den Gang der Untersuchung rekapitulieren und die wesentlichen Ergebnisse zusammenfassen.

Die der Arbeit zugrunde liegende Frage lautete nach der Dauer der Lufteinwirkung, nach welcher vegetative Zustände und Sporen obligat Anaërober getötet werden. — Um den Sauerstoff möglichst intensiv auf die einzelnen Keime einwirken zu lassen, wurden diese in Nähragar gut verteilt und damit Platten in dünner Schicht gegossen. Bei dieser Versuchsanordnung kommt der Sauerstoff als einziger schädigender Faktor in Frage. Daß bei der Übertragung in Agar die Keime durch die dabei nötige Temperaturerhöhung auf 45 bis 50° nicht getötet werden, wurde durch besondere Versuche mit Überimpfung ohne Luftzutritt erwiesen (p. 17).

Es zeigte sich, daß die vegetativen Zustände der untersuchten Arten (*Bac. amylobacter*, *Bac. botulinus*, *Paraplectrum foetidum*) gegen Sauerstoffeinwirkung ganz überraschend empfindlich sind. Es genügte in einigen Fällen voller Luftzutritt von etwa 10 Minuten Dauer, um alle Keime zu töten (vergl. Tabellen II—IV). Diese Zeit ungehinderten Luftzutritts gibt allerdings nicht diejenige der schädigenden Sauerstoffwirkung ganz an, da durch das Auspumpen die Luft aus dem Agar nicht momentan entfernt wird. Es vergehen vielmehr 1 bis 2 Stunden, ehe eine sicher unschädliche Konzentration des Sauerstoffs herbeigeführt ist (s. p. 9 ff.). Daß man hiermit rechnen muß, geht aus einem Versuche hervor, bei dem mit dem anaëroben zugleich ein obligat aërober *Bacillus* ausgesät wurde. Es entstanden in diesem Falle außerordentlich viel mehr Kolonien als auf der Kontrollplatte ohne den Aëroben (s. p. 7). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die vegetativen Zustände bei Verteilung in Agar unter dem Einflusse des Sauerstoffs in 10—60 Minuten vollen Luftzutritts und 1—2 Stunden allmählich abnehmenden Sauerstoffdruckes größtenteils zugrunde gehen. Dasselbe gilt bei Aufstrich auf Agar (s. p. 10). Dagegen erschien die Resistenz sehr viel größer, wenn ich die Luft auf junge Bouil-

¹⁾ v. Hibler, Zur Kenntnis der durch anaërobe Spaltpilze erzeugten Infektionskrankheiten usw., Centr. f. Bakt., I. Abt., Origin. 25. 1899. p. 519.

lonkulturen einwirken ließ und die Keime erst nach dem Evakuieren in Agar verteilte. Die Resistenz erwies sich hierbei indes von der Dichte des Versuchsmaterials in hohem Maße abhängig, indem durch Verdünnen der Bouillonkulturen mit steriler Bouillon die Tötungszeit wesentlich abgekürzt wurde. Da mit der Verteilung in Agar eine wesentliche Verdünnung des Materials verbunden ist, so wird es verständlich, daß die Tötungszeit davon abhängt, ob die Impfung in den Agar vor oder nach der Lufteinwirkung geschieht.

Die Dauer der Beweglichkeit bei Luftzutritt ist ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße, von der Dichte der Keime abhängig. Sie beträgt meist einige Stunden, unter Umständen bis zu einem Tage. Doch genügt schon eine sehr kurze Lufteinwirkung ($\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde) um die Mehrzahl der Individuen ihrer Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit zu berauben. Denn wenn die zur Untersuchung dienenden Kammern nach kurzem Luftzutritt mit Wasserstoff gefüllt wurden, so hörte auch hier die Bewegung der meisten Keime auf, nur in etwas längerer Zeit als unter dauerndem Luftzutritt und eine Weiterentwicklung und Vermehrung derselben trat anscheinend nicht ein.

Unterschiede in der Sauerstoffresistenz je nach dem Entwicklungsstadium habe ich nur bei *Paraplectrum foetidum* sicher feststellen können. Ganz junge vegetative Stadien fand ich weniger empfindlich. Bei Verteilung in Agar dürften sie teilweise bis zu 20 Stunden am Leben bleiben (Versuch 5, Tab. II). Eine ähnlich hohe Resistenz weisen ältere Stäbchen auf, bei denen die Sporenbildung schon vorgeschritten ist. Junge Sporenstadien sind dagegen sehr empfindlich. Der Übergang von empfindlichen zu resistenten Formen geht bei *Paraplectrum foetidum* sehr allmählich, bei *Bac. amylobacter* besonders plötzlich vor sich.

Die Sporen zeigen an Luft unter den gegebenen Bedingungen (Verteilung in Agar) ebenfalls keine sehr große Lebensdauer. Die Mehrzahl von ihnen ist schon nach etwa 8 Tagen nicht mehr keimfähig. Eine sehr merkwürdige Tatsache ist, daß in mehreren Versuchen die Zahl der entstehenden Kolonien (also auch der keimenden Sporen?) bis zu einer gewissen Zeit mit der Dauer der Lufteinwirkung zunahm. Ich habe versucht, diese Erscheinung aus den guten Entwicklungsbedingungen und der wachstumshemmenden Wirkung des Sauerstoffs zu erklären. Auch dafür, daß die Sauerstoffresistenz der Sporen in meinen Versuchen überhaupt sehr

gering ist, möchte ich als Erklärung heranziehen, daß der Sauerstoff der einzige entwicklungshemmende Faktor ist, während sonst alle Keimungsbedingungen vorhanden sind. Dafür spricht, daß die Wirkung des Sauerstoffs bei niedriger Temperatur sehr viel schwächer ist und vor allem, daß die Sporen, wenn sie unter den Bedingungen ihrer Entstehung (bei Nahrungsmangel und in Gegenwart ihrer Stoffwechselprodukte) an Luft aufbewahrt wurden, teilweise länger als 500 Tage keimfähig blieben.

Die vorliegenden Resultate lassen sich mit den in der Einleitung zitierten Erfahrungen von Pasteur, Luederitz und Chudiakow recht gut in Einklang bringen, doch muß man sich natürlich hüten, sie auf alle obligat Anaeroben anwenden zu wollen. Lediglich die typischen sporenbildenden Arten dürften sich den von mir untersuchten ähnlich verhalten. Die asporogenen Arten dagegen scheinen gegen Sauerstoff viel weniger empfindlich zu sein, wie aus Angaben über ihre Vitalität hervorgeht¹⁾, doch fragt es sich, ob nicht auch sie sehr schnell zugrunde gingen, wenn sie einer so intensiven Sauerstoffeinwirkung ausgesetzt würden, wie sie in meinen Experimenten verwendet wurde. Andererseits ist es ja möglich, daß die asporogenen Arten unter schlechten Lebensbedingungen auch Ruhestadien bilden, die morphologisch sich nicht von den wachstumstätigen Stadien unterscheiden lassen. Es würden ihnen gegenüber dann ähnliche Betrachtungen gelten, wie ich sie über den Einfluß des Sauerstoffes auf die Sporen der von mir untersuchten Arten angestellt habe.

Besonders möchte ich noch darauf hinweisen, daß es fraglich ist, inwieweit meine Ergebnisse bei anderen als den in meinen Versuchen vorhandenen Kulturbedingungen gültig bleiben, insbesondere ob den Anaeroben in der Natur eine ebenso große Empfindlichkeit zukommt, wie in meinen Experimenten. Der neuerdings von Beijerinck²⁾ ausgesprochene Gedanke, daß die anaeroben Bakterien in ihrer Sauerstoffempfindlichkeit „Umstimmungen“ erleiden können, ist nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen. Die größte Bedeutung wird aber anerkanntermaßen der Symbiose oder Metabiose mit aeroben Organismen zukom-

¹⁾ Z. B. die anaeroben Kokken, aber auch Bazillen, sind öfters nach mehreren Tagen noch überimpfbar bezeichnet. Angaben bei Jungano et Distaso, Les Anaérobies. Paris 1910.

²⁾ Beijerinck, Mutation bei Mikrobien. (Folia microbiolog. Holländ. Beitr. z. ges. Mikrobiol. I. 1912. p. 13.)

men, für die ja einige sichergestellte Beispiele existieren. Sie interessiert uns besonders bei der Betrachtung meiner Resultate, da ja auch das gesellige Zusammenleben vieler Individuen einer Art als Symbiose bezeichnet werden kann. Die Abhängigkeit der Giftwirkung des Sauerstoffs von der Dichte des Bakterienmaterials erhält damit eine besondere Bedeutung¹⁾. Ich gehe darauf noch etwas näher ein. Da die Anaëroben den Sauerstoff verbrauchen²⁾, ist die Zeit der Lufteinwirkung, nach welcher ein Individuum getötet wird, davon abhängig, mit welcher Geschwindigkeit und in welcher Menge diesem der Sauerstoff zugeführt wird. Deshalb werden die Anaëroben bei sehr dichtem Wachstum und bei kleiner dem Sauerstoff exponierter Oberfläche nicht geschädigt werden. Da sie autoxydable Stoffwechselprodukte bilden, werden diese bei geeigneter Verdünnung des Materials je nach der Größe der Oberfläche weniger oder mehr die Schädigung durch den Sauerstoff verzögern können. Gerade die Wirkung der reduzierten und reduzierenden Stoffwechselprodukte erscheint mir zum Verständnis der uns begegneten Verhältnisse wichtig. Denn sie werden ja bei der Verdünnung mit verdünnt. Sie können es hindern oder verzögern, daß der Sauerstoff überhaupt in schädigender Menge an die anaëroben Keime herantritt. Dagegen müssen wir, wie ich schon bei der Kritik der Methode darlegte, einen sehr hohen Sauerstoffverbrauch durch die Anaëroben voraussetzen, wenn wir annehmen wollen, daß sie direkt durch Atmung dessen Zutritt wesentlich aufhalten und seine Konzentration herabsetzen können. Wir können uns also vorstellen, daß die Anaëroben sozusagen die Waffen gegen den Sauerstoff in ihrer Umgebung anhäufen, sie sind daher wehrlos, wenn man sie in eine andere Umgebung versetzt.

Ob die Stoffwechselprodukte der Anaëroben lediglich als Sauerstoffabsorbenten schützend wirken, ist vorläufig nicht zu entscheiden. Immerhin ist es interessant, daß wir hiermit schließlich zu ganz ähnlichen Fragen gelangen, wie sie für die Symbiose obligat Anaërober mit anderen Bakterien längst gestellt worden sind. Kedrowsky³⁾ hat zuerst den Zweifel an der Pasteurschen Annahme ausgesprochen, daß die aëroben Bakterien ledig-

¹⁾ In diesem Sinne sind vielleicht die Erfolge Kitts zu erklären. (Die Züchtung des *Rauschbrandbacillus* bei Luftzutritt, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. 17. 1895.)

²⁾ Chudiakow, l. c. 1898, p. 389.

³⁾ Kedrowsky, Über die Bedingungen, unter welchen anaërobe Bakterien auch bei Gegenwart von Sauerstoff existieren können. (Zeitschr. f. Hyg. 20. 1895. p. 358.)

lich durch Verbrauch des Sauerstoffs den Anaëroben Existenzbedingungen schaffen. Es erscheint mir aber erst durch Versuche Bienstocks¹⁾ erwiesen zu sein, daß obligat anaërobe Bakterien durch Stoffwechselprodukte eines Sauerstoffzehrers zu Wachstum bei Luftzutritt zu bringen sind. Wie diese Stoffwechselprodukte wirken, ist noch völlig unbekannt.

Zum Schluß möchte ich noch kurz darauf eingehen, ob wir aus den Resultaten dieser Arbeit schon irgendwelche Schlüsse auf die Art der Giftwirkung des Sauerstoffs ziehen können. Ich habe schon darauf hingewiesen (s. p. 31—32), daß der Protoplast kaum direkt vom Sauerstoff beeinflußt werden kann, sondern daß die Voraussetzung zu einer Einwirkung desselben Stoffwechselvorgänge sind.

Der außerordentlich schnelle Verlust der Vermehrungstätigkeit macht es wahrscheinlich, daß der Sauerstoff unmittelbar in den Stoffwechsel der Anaëroben eingreift. Kruse²⁾ äußert die Ansicht, daß bei Gegenwart von Sauerstoff die obligat Anaëroben einen für sie giftigen Stoff bilden. Derselbe müßte in sehr kurzer Zeit entstehen und wenn wir nicht annehmen wollen, daß eine Vorstufe von ihm in größerer Menge schon präformiert sei, so ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß er sich als Stoffwechselendprodukt bis zu letaler Dosis anhäufen kann. Es hängt dann im Grunde nur von der Bestimmung des Begriffes Stoffwechsel ab, ob man von einer direkten oder indirekten Beeinflussung desselben durch den Sauerstoff sprechen will.

Die nunmehr naheliegende Frage, welcher Teil des Stoffwechsels besonders oder ausschließlich vom Sauerstoff beeinflußt wird, ist natürlich auf Grund meiner physiologischen Untersuchung nicht zu beantworten. Die restlose Aufklärung der zuletzt berührten Probleme wird schließlich, wie so vieles, chemischen Untersuchungen vorbehalten sein. Ich hoffe aber wenigstens durch meine Arbeit gezeigt zu haben, daß auch auf rein experimentell-physiologischem Wege zur Klärung der Anaërobiotfrage, zur Präzisierung der Fragestellung noch viel getan werden kann.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Botanischen Institut der Universität Leipzig ausgeführt. Es sei mir gestattet, dessen Vorstand, Herrn Geheimen Rat Pfeffer, für die reiche Förderung, die er meiner Arbeit

¹⁾ Bienstock, Anaërobies et symbiose. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 17. 1903. p. 850.)

²⁾ Kruse, Allgemeine Mikrobiologie 1910. * 31.

jederzeit angedeihen ließ, auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank auszusprechen. Außerdem bin ich den Assistenten des Instituts, den Herren Swart und Privatdozent Dr. Buder, vor allem aber Herrn Professor Dr. Miehe für seine wertvollen Ratschläge bei Abfassung der Arbeit zu herzlichem Danke verpflichtet.

Leipzig, den 3. Juni 1912.

Nachdruck verboten.

Spirillum bataviae n. sp.

Von Dr. F. C. von Faber, Buitenzorg.

Mit 1 Fig. im Text.

Die Spirillen gehören zu den größten Vertretern der Schizomyceten und immer werden wieder neue entdeckt, die an Größe die schon bekannten übertreffen. So fand ich im Brunnenwasser einer Koralleninsel in der Bucht von Batavia einen Vertreter dieser Gruppe, der an Dimension das größte bis jetzt bekannte *Spirillum*, *Spirillum volutans* Ehrenberg emend. Cohn et Kutscher, noch übertrifft.

Dieses *Spirillum*, das ich seines Fundortes wegen *Sp. bataviae* n. sp. genannt habe, kommt in dem süßen Wasser des Brunnens gemeinschaftlich mit einer Rotalge (*Polysiphonia*) vor und entwickelt sich besonders lebhaft, wenn man etwas von dem Wasser mit der Alge im Dunkeln stehen läßt. Das Wasser färbt sich dann nach zwei bis drei Tagen auffallend weinrot und verbreitet einen starken Indolgeruch. Ein Tropfen dieses Wassers unter dem Mikroskop betrachtet, läßt schon mit schwacher Vergrößerung die auffallend großen Spiralen erkennen, die in größeren Massen deutlich rötlich schimmern und sich mit verschiedener Geschwindigkeit und wechselnden Ruhepausen durcheinander drehen. Bei langsam rotierenden Individuen kann man an beiden Enden zwei kurze, peitschenartige Geißeln beobachten.



Fig. 1. *Sp. bataviae* n. sp.
Präparat nach dem Tuscheverfahren
hergestellt und photographiert.
Vergr. etwa 800.

An nach dem Burrischen Tuscheverfahren hergestellten Präparaten treten die Geißeln scharf hervor. Innerhalb des Spirillenkörpers sind am lebenden Präparat kleine, lichtbrechende Kügelchen wahrzunehmen, die wahrscheinlich die sogenannten *Volutanskugeln*, nach denen *Spirillum volutans* genannt worden ist, darstellen. An Individuen, die keine rasche Bewegungen ausführen, sieht man ab und zu deutlich hornartig gekrümmte Ausläufer der Spiralen. Ähnliche Bildungen fand Kutscher¹⁾ bei *Sp. undula*, *Sp. volutans* und bei *Vibrio serpens*. Die Frage, ob es sich dabei um echte Verzweigungen handelt, möchte ich unentschieden lassen.

¹⁾ Kutscher, Die Vibrionen- und Spirillenflora der Düngerjauche. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 20. 1895. p. 46.)

Die Anreicherung der betreffenden Spirillen geschah in der Peptonvorkultur, woraus dann Peptonagarplatten angelegt wurden. Solche Agarplatten, die bei Zimmertemperatur (26—28° C) stehen, zeigen nach 24 Stunden kleine Kolonien. Klatschpräparate wiesen das Vorhandensein der Spirillen auf, so daß die Möglichkeit gegeben war, von den Kolonien abzuimpfen und weiter zu züchten. Als flüssiges Nährsubstrat erwies sich die von Kutscher¹⁾ angegebene Nährflüssigkeit für Spirillen als sehr günstig.

Die Reinkultur zeigt eine große Mannigfaltigkeit in der Form und Größe der Spirillen, so daß man annehmen könnte, es mit einer Mischkultur zu tun zu haben. Sporenbildung habe ich niemals beobachtet, Deckgläschen, die mit Spirillenmassen bestrichen und 48 Stunden eingetrocknet waren, sind gänzlich steril geblieben. Temperaturen von 60—65° C genügen, um die Spirillen innerhalb 5 Minuten abzutöten.

Diagnostische Merkmale.

Fäden spiralgig gewunden, Höhe einer Windung 7—8,5, Länge 15,8, meist 3—4 Windungen vorhanden. In der Kultur Formen kleiner werdend. An den Enden 2 kleine Geißeln vorhanden. Kolonien auf Agar anfangs rund, glattrandig, später gefranst; Mittelpunkt der Kolonie weinrot, nach dem Rande hin gelblichgrün. Auf Gelatine kleine, gelbliche, schlechtwachsende Kolonien. Der Agarstich wächst unterhalb der Oberfläche walzenförmig aus und färbt sich weinrot. Agarstriche zeigen spärliches Oberflächenwachstum. In Bouillonkultur²⁾ starke Trübung ohne Hautbildung. Gelatine wird nicht verflüssigt. Färbt sich nach Gram. Indol wird reichlich gebildet. Gedeiht im Anfang am besten anaërob, später auch aërob.

Buitenzorg, Juni 1912.

Botanische Laboratoria 'sLands Plantentuin.

Nachdruck verboten.

Studien über die rationelle Herstellung des Parmesan-(Grana-) Käses.

Dritter Bericht³⁾.

Über die Reifung der Milch bei der Fabrikation des Granakäses.

Von Prof. Dr. Costantino Gorini,

Direktor des bakteriologischen Laboratoriums an der K. landw. Hochschule zu Mailand.

Hygienische Behandlung der Milch und Anwendung von Reinkulturen, das sind, wie ich schon in andern Abhandlungen dargelegt habe, die beiden Anforderungen, die die Grundlage

¹⁾ Nach Kutscher verfuhr ich bei der Herstellung des flüssigen Nährsubstrates folgendermaßen: Einem Kolben mit Wasser wurde 2 Proz. Agar zugesetzt, der Kolben dann 48 Stunden bei etwa 37° C im Brutschrank belassen und der Agar danach ausgepreßt. Auf diese Weise erhält man eine farblose, etwas opaleszierende Flüssigkeit, der ein wenig steriles Fleischwasser und $\frac{1}{2}$ Proz. Kochsalz zugesetzt wurde. Die Nährlösung wird mit Ammoniumpentasulfid neutralisiert, sterilisiert, dann filtriert, das Filtrat auf Reagensgläser abgefüllt und nochmals sterilisiert.

²⁾ Vergl. die eben angeführte Nährlösung nach Kutscher.

³⁾ S. die vorigen zwei Berichte in diesem Centralblatt. Abt. II. Bd. 15. 1905. p. 731; Bd. 21. 1908. p. 309.

meiner Studien über die rationelle Herstellung des Käses im allgemeinen und des Granakäses im besonderen bilden. Nach diesen beiden Anforderungen richtet sich auch die Tätigkeit der nun schon seit 9 Jahren bestehenden „Genossenschaft zur Förderung der Herstellung des Granakäses“ (Associazione „Pro Grana“), welche aus Landwirten, Käsefabrikanten und Käsegroßhändlern besteht und von Herrn Senator Julius von Vigoni als Vorsitzenden geleitet wird, den ich schon in früheren Schriften ehrend erwähnt habe. Aus den Jahresberichten, die die Gesellschaft dem Landwirtschaftsministerium eingereicht hat (s. Boll. Uffic. del Minist. di Agricolt. Jahrg. 1904 ff.), ist hervorzuheben, daß im Jahre 1903 die Versuchsmeierei zu Trenno und im Jahre 1905 das Laboratorium zur Herstellung und zum Vertrieb von Reinkulturen eingerichtet wurde, sowie daß im Jahre 1909 diese Reinkulturen auch in den großen Molkereien Aufnahme gefunden haben.¹⁾ Heute nun hat man mit den Reinkulturen schon beachtenswerte Erfolge erlangt, da die Methode, die die Verwendung derselben vorschreibt, allgemein eingeführt ist und sich als sehr wirksam erwiesen hat, die meisten Hartkäse, den Lodisaner (Lombardischen) und Reggianer (Emilianischen Grana), den Montasio (Iriuli), den Bitto (Valtellina), den Branzi (Bergamo), den Cacio cavallo (Italia meridionale), mehrere Schweizer Typen zu verbessern. Als Beweis hierzu dienen die Bezeugungen der praktischen Käser und Käsefabrikanten, die Auszeichnungen, die den mit Reinkulturen hergestellten Käsen bei den letzten Weltausstellungen und bei größeren Wettbewerben zu teil geworden sind, und besonders auch der Umstand, daß viele Meiereien und Großmolkereien die neue Methode schon seit mehreren Jahren angenommen haben. (S. Nachtrag.)

Wenn aber die oben erwähnten Erfolge dazu geführt haben, das Prinzip der Anwendung von Reinkulturen von Milchsäurebakterien als richtig hinzustellen, da sie den Vorzug dieser Methode vor der Anwendung von Molken oder unreinen Kulturen beweisen, so liegt der Gesellschaft „Pro grana“ in höherem Maße als bisher die weitere Aufgabe ob, die durch die zweite der oben angegebenen Anforderungen bedingt wird, nämlich, die Großmolkereien und die Meiereien zu überzeugen, daß die Anwendung der Reinkulturen nur dann zu den Erfolgen führt, die sich durch sie erreichen lassen, wenn zugleich eine hygienische Behandlung (bei der Ernährung der Kühe, beim Melken, Filtrieren und Abkühlen der Milch usw.) stattfindet. Diese hygienische Behandlung steht in enger Beziehung zu der Hauptsorge der Produzenten des Granakäses, nämlich zu der Behandlung der Milch, ehe dieselbe in den Kessel geführt wird.

* * *

Die Hersteller des Granakäses lassen sich bei der Behandlung der Milch, ehe diese in den Kessel kommt, von zweifacher Rücksicht leiten oder sind vielmehr von einer doppelten Sorge erfüllt; sie sehen nämlich auf einen angemessenen Ertrag an Butter und auf einen angemessenen Grad der Reifung der Milch.

¹⁾ Es möge hingewiesen werden auf die Referate von Dr. Kaufmann über die Jahresberichte der Genossenschaft „Pro Grana“ in „Milch-Zeitung“ 1910, No. 47, p. 556 (über 1907—1908), 1911, No. 27, p. 265 (1908—1909), „Milchwirtschaftliches Centralbl.“ 1912, Heft 6, p. 178 (über 1910—1911), sowie auf dessen Referat über Gorini, Versuch zur Verbreitung wissenschaftlichen Verfahrens bei der Käsebereitung auf den italienischen Alpen in „Milch-Zeitung“ 1911, No. 23, p. 226.

Dies entspricht genau den Erfordernissen zur Herstellung des Grana-käses. Wie seit langer Zeit durch die Untersuchungen der italienischen Chemiker und Molkereikundigen nachgewiesen ist, muß die Milch für den Grana halbfett sein und eine gewisse Reife, sagen wir lieber, einen gewissen Säuregrad haben, wofern nur diese Säure von guten Reifungsbakterien herrührt.

Wird eine zu fette Milch angewandt, so erhält man nicht den Grana, sondern einen anderen Typus (der den Schweizer Typen ähnlich ist). Wird eine frische, süße Milch angewandt, so entstehen Käse, die man als zu lebhaft bezeichnet, d. h. Käse, mit zu viel Löchern (zu viel Ansatz), und auch geblähte Käse. Aber sowohl das Magersein als auch die Reife der Milch müssen sich in gewissen Grenzen halten.

Dies ist wohl zu beachten, denn wenn man eine zu stark abgerahmte Milch nimmt, so erhält man Magerkäse, welche vom Grana abweichen und nicht mehr Granakäse genannt werden dürften.

Wird eine zu reife Milch angewandt, so entstehen Käse, die nicht arbeiten, die nicht gären, tote Käse, sogenannte „p a n e l l i“ (Käsebrote) oder bröcklige Käse, „s f o g l i e“ (blätterige Käse) oder Gläserlkäse, mit einem Worte, nicht lebensfähige Käse. Die Schwierigkeit besteht für den Käser darin, den richtigen Augenblick abzufassen, in dem die Milch angemessen fett und angemessen reif ist.

Die beiden Erfordernisse, dasjenige des Entrahmens und dasjenige der Reifung der Milch, erreicht man gleichzeitig, indem man die Milch in besonderen metallischen oder hölzernen Behältern, in Becken, Satten, Bütten (sogenannte „bacinelle, piatte, mastelle“), je nach der Gegend, stehen läßt. Aber nur zu oft treten die beiden Erscheinungen nicht einander entsprechend ein, da sie ja nicht denselben Gesetzen unterworfen sind, indem die eine physikalischer und die andere biologischer Natur ist.

Während des Stehens der Milch geht sowohl das Aufsteigen des Rahms (physikalische Erscheinung) als auch die Vermehrung der Keime, die die Reifung der Milch hervorrufen (biologische Erscheinung), vor sich.

Zuweilen geschieht es, daß sich die geeignete Reifung der Milch eher vollzieht, als eine genügende Fettmenge aufgestiegen ist; zuweilen kann das Umgekehrte eintreten, daß nämlich die Milch nur sehr langsam reift, während sie durch Aufrahmen schon genügend mager geworden ist. Im ersteren Falle, der besonders in der heißen Jahreszeit eintritt, wird man durch die Rücksicht auf den Butterertrag leicht dazu geführt, die Milch überreif werden zu lassen, wobei sich denn die nicht lebensfähigen Käse, über die oben Klage geführt worden ist, ergeben. Im zweiten Fall, der besonders in der kalten Jahreszeit zur Geltung kommt, wird man durch die Rücksicht auf die notwendige Reifung der Milch verleitet, eine übermäßige Menge von Rahm sich abscheiden zu lassen, wodurch man denn die Magerkäse erhält, die wir oben als ungeeignet zurückgewiesen haben.

* * *

Das Übel ist, daß innerhalb so vieler Klippen der Käser an der am wenigsten gefährlichen oder derjenigen wenigstens, die ihm am wenigsten gefährlich erscheint, vorbeizukommen sucht.

Er weiß mit Sicherheit, daß, je länger er die Milch stehen läßt, um so größer der Butterertrag ist; dies ist ein fester Anhalt. Andererseits ist für ihn das Ergebnis aus einer angemessenen Reifung der Milch etwas ganz und gar Ungewisses. Während der Theorie nach auch die Reifung der Milch

zugleich mit dem längern Stehenbleiben derselben in den Satten fortschreiten müßte, geschieht es hingegen in der Praxis oft, daß sie bald zu schnell, bald zu langsam vor sich geht und zwar aus Gründen, die dem Käser größtenteils unbekannt und für ihn unbegreiflich sind; oft genug beklagt sich der Käser vielmehr, daß die Milch, anstatt im Reifen fortzuschreiten, hierin zurückgeht, je länger er sie stehen läßt.

Alles dies ist aber leicht zu begreifen nach allem dem, was die bakteriologische Forschung uns gelehrt hat. Wir wollen nur daran erinnern, daß die Vermehrung der Mikroflora der Milch die Reifung derselben mit größerer oder geringerer Schnelligkeit nicht nur nach Maßgabe der Temperatur, sondern vor allem auch nach Maßgabe der Quantität und der Qualität des Mikrobengehalts bewirkt; zuweilen kann sie auch zu einer falschen Reifung führen, wenn nämlich der Mikrobengehalt ein solcher ist, daß endlich nicht die guten Milchsäurebakterien, sondern die dem Käse nachteiligen Mikroben die Oberhand gewinnen.

Nun, alles dieses weiß der Käser nicht; er weiß nicht, was für ein Kampf sich im Verborgenen zwischen den unendlich kleinen Lebewesen, die sich im Innern der Milch befinden, entwickelt; er vermutet auch nicht, daß dieser Kampf, je nach der Art der obsiegenden Mikroben, ihm bald eine zur Verarbeitung geeignete Milch, eine sog. „latte umana“ (humane Milch), bald eine zur Verarbeitung ungeeignete Milch, eine sog. „latte rabbiosa“ (herbe Milch) liefern wird.

Der Käser weiß nur, daß sich von einer zu herben, nicht genügend zur Ruhe gekommenen Milch zu lebhaften Käse ergeben, Käse, die unfehlbar blähen werden; deshalb schreibt er jedesmal, wenn solche Käse zustande kommen, die Schuld hieran dem unzureichenden Stehenbleiben der Milch in den Satten zu, ohne auch nur daran zu denken, daß es sich oft vielmehr um eine übermäßige Reifung oder um eine falsche Reifung handelt! Daher läßt er sich endlich dazu verleiten, immer und zwar in jedem Fall die Milch möglichst lange stehen zu lassen, weil er glaubt, in dieser Weise zu gleicher Zeit den beiden ihm vorschwebenden Anforderungen, nämlich dem Butterertrag und der Reifung der Milch, zu genügen. Man frage doch nur irgend einen Käser, warum er die Milch so lange stehen läßt, ehe er sie in den Kessel schüttet; man wird 99mal in 100 Fällen die Antwort hören, daß die Milch so frisch ist, so lebendig ist, so herb ist, gar nicht reifen will!

Bei diesen Erwägungen kommt er dann endlich dazu, meistens nicht lebensfähige Käse zu fabrizieren.

Wir wollen nicht untersuchen, ob dieses immer in gutem Glauben geschieht.

Anderseits ist es nur zu menschlich, bei dem Bedenken, daß man zu wenig Butter und geblähten Käse erhält, lieber eine reichliche Menge Butter ausbeuten zu wollen, da diese sicherlich gelingt und sich schnell zu ergiebigem Preise verkauft, und den Käse in die zweite Linie zu versetzen, da dessen Gelingen heutzutage noch ungewiß ist, sein Verkauf in weiter Zukunft liegt und sein Preis sich nicht vorhersehen läßt.

Möge nun im guten oder im schlechten Glauben gehandelt werden, Tatsache ist, daß bei den heutigen Verarbeitungsweisen die Käser nicht nur einen Anlaß, sondern auch eine Rechtfertigung zu haben vermeinen, wenn sie Granakäse fabrizieren, die an zwei sehr schweren Fehlern leiden, nämlich daß sie zu mager sind und eine zu kurze Lebensfähigkeit haben und anderseits, daß sie mit normalen Gärungen behaftet sind.

Wenn wir den Käser veranlassen wollen, einen andern Weg einzuschlagen (und wir müssen sie hierzu veranlassen, um eine Verbesserung des Grana herbeizuführen), so gibt es nur ein Mittel: wir müssen ihnen die Sorge um die Reifung der Milch, ehe diese in den Kessel gefüllt wird, nehmen.

Ein solches Mittel wird uns gerade jetzt durch die Reinkulturen, im Verein mit hygienischer Behandlung, geboten.

Und zwar mit Recht; einerseits rät uns die hygienische Behandlung, das Verbleiben der Milch in den Satten möglichst abzukürzen, damit, wenn in der Milch dem Käse nachteilige Bakterien vorhanden sind (und in der Regel sind sie darin vorhanden), diese nicht Zeit haben, sich in gefahrbringendem Maße zu vermehren.

Andererseits rät uns die Anwendung der Reinkulturen, lieber eine süße, frische Milch in den Kessel zu füllen, denn diese hat hinreichend Zeit und Gelegenheit, in der Folge, während der Verarbeitung, zu reifen, da bei dem Vorgange der Verarbeitung zunächst die Milch und sodann der Quarg den verschiedenen Temperaturen des Gerinnens, der Perioden des Abwartens, des Kochens, des Abbrühens, des schließlichen Warmbades ausgesetzt werden und diese Temperaturen gerade der Vermehrung und dem endlichen Siege der guten Keime gegenüber den schädlichen sehr günstig sind.

Indem so die Sorge um die Reifung der Milch ausgeschieden ist, läßt sich das Stehenbleiben derselben in den Satten oder Büten in der Weise beschränken und regeln, daß auf jeden Fall sowohl eine zu weit vorgeschrittene Reifung der Milch, als auch eine schädliche Vermehrung der dem Käse nachteiligen Keime verhindert wird, wobei nur eine eben angemessene Aufrahmung stattfindet. Die rationelle Dauer des Stehenbleibens der Milch sollte sich nach unserm Urteil und unserer Erfahrung nicht über 18 Stunden in der kalten Jahreszeit und nicht über 12 Stunden in der warmen Jahreszeit, in welcher es sich außerordentlich empfiehlt, das Abkühlen der Milch anzuwenden, ausdehnen. Gegenwärtig läßt man die Milch nicht selten zwei oder drei Tage lang stehen!

* * *

Nun möge auch die zweite Sorge näher erwogen werden, nämlich die Sorge um den Butterertrag, und schon höre ich, daß man mir entgegenhält, ob nicht bei dieser Verkürzung des Stehenbleibens der Milch die Gefahr eintreten wird, daß man eine zu fette Milch in den Kessel füllt, so daß ein Teil der Butter verloren geht. Dieser Einwurf läßt sich leicht zurückweisen. Wo soll denn dieses Butterfett verloren gehen?

Es bleibt im Käse zurück! Und wenn das der Fall ist, so erhält man doch ein größeres Gewicht an Käse und außerdem Käse von höherem Wert.

Es geht in die Molken über!

Die Partie Fett, die in den Molken zurückbleibt, läßt sich doch aus denselben durch die Zentrifuge wiedergewinnen, worauf man aus diesem Fett „Molkenbutter“ herstellt; diese kann, wenn sie gut zubereitet wird und von einer hygienisch behandelten Milch stammt, zu der gute Bakterien zugesetzt sind, ein vortreffliches Produkt sein und denselben Wert haben, wie Butter aus Rahm. Auf diese Weise erlangt man aber nicht allein eine angemessene Menge guter Butter, sondern entgeht auch der Gefahr, einen Grana zu fabrizieren, der nicht hinreichend fett ist, und dies ist einer der schlimmsten Mißstände bei dieser Käsegattung. Tatsache ist, daß, während dieser Käse we-

nigstens 30 Proz. Fett in bezug auf den Trockenrückstand haben müßte, er sehr oft, ja zu oft, weniger als 20 Proz. enthält.

Das Ergebnis des kürzlich abgehaltenen Wettbewerbs unter Herstellern von Granakäse, welcher von der „Landwirtschaftsgesellschaft für die Lombardei“ (Società Agraria di Lombardia) veranstaltet worden ist, möge in dieser Hinsicht lehrreich sein¹⁾.

Es möge noch bemerkt werden, daß das Magersein des Käses auch jenes besondere Bittersein mit sich bringt, welches nur zu oft den Geschmack des Grana verschlechtert.

Das oben Gesagte können wir mit gutem Recht auf Grund der Erfahrungen anführen, die seit mehr als einem Jahre in einer der Meiereien, die unsere Methode befolgen, gemacht worden sind (es ist die Meierei Uggeri des Senator Julius von Vigoni, wo einer der Käser, die bei dem oben erwähnten Wettbewerb ausgezeichnet worden sind, tätig ist). Dort hat man feststellen können, daß bei dem neuen Verfahren, das Stehenbleiben der Milch abzukürzen und dann die Molken zu entrahmen, sowohl an Butter aus Rahm als auch an Butter aus Molken sich fast 100 g Butter mehr pro Hektoliter Milch ergab gegenüber der allein in Betracht gezogenen Butter aus Rahm, die man nach dem alten Verfahren erhielt, die Milch in der Weise mehr ausnutzen zu wollen, daß man sie länger stehen ließ. Dennoch ergibt sich heute in der Meierei Uggeri ein Käse, der schwerer und fetter ist als derjenige, den man früher erhielt. Dies deutet darauf hin, daß auch bei dem alten Verfahren ein Teil des Fetts in den Molken verbleibt. Folgendes sind die Resultate von vergleichenden Versuchen, die mit dem Entrahmen der Molken nach beiden Versuchsweisen ausgeführt worden sind:

Altes Verfahren mit übermäßigem Ausnutzen der Milch in den Satten:

Als Butter aus Rahm	kg 2,700
wenn die Molken entrahmt werden: Molkenbutter . . .	„ 0,275
Pro Hektoliter . . .	kg 2,975

Neues Verfahren mit verkürztem Stehenlassen der Milch:

Als Butter aus Rahm, nur	kg 2,400
aber als Molkenbutter	„ 0,375
	kg 2,775.

Also nach dem neuen Verfahren wurden sowohl an Butter aus Rahm als auch an Butter aus den Molken 75 g mehr an Butter gegenüber der allein in Betracht gezogenen Butter aus Rahm, die man nach dem alten Verfahren erhält, gewonnen. Es werden jedoch 200 g weniger gewonnen, als derjenige Betrag ausmacht, den man erhalten würde, wenn man zu der Butter aus Rahm nach dem alten Verfahren auch noch die Butter von dem Entrahmen der Molken hinzufügen wollte. Also verbleiben nach dem neuen Verfahren 200 g mehr an Fett in dem Käse auf jedes Hektoliter Milch, d. h. auf je ungefähr 5½ kg Käse.

Man wird etwa fragen, ob die Kosten für die Anschaffung und den Betrieb der Zentrifuge so groß sind, daß sie die Vorteile, die das neue Verfahren bietet, zunichte machen oder gar übersteigen. Dieses Bedenken wird hin-fällig gemacht durch die Daten, die die Verwaltung des angesehenen Ritter-hauses von Vigoni mir hat zukommen lassen. Aus diesen Daten (die

¹⁾ An diesem Wettbewerb beteiligten sich auch zwei von den Käsern, die seit einigen Jahren nach unserer Methode arbeiten; beide gehörten zu denen, die die höchsten Ehrenpreise erhielten.

ich der Kürze wegen hier nicht anführen will) geht hervor, daß die Anschaffungskosten für die Zentrifuge schon in einem Jahre durch die alleinige Ausbeute an Molkenbutter eingebracht worden sind. Was die Betriebskosten für die Zentrifuge angeht, so reduzieren sich dieselben auf ein Geringes; bei ungefähr 10 hl Milch beliefen sie sich auf ungefähr 1,50 Lire (1,20 Mark) täglich, gegen eine Ausbeute von ungefähr 12,50 Lire (10 Mark) für Molkenbutter, welche zu demselben Preise, nämlich zu 2,80 Lire (2,24 Mark) wie die Rahmbutter verkauft wird. Nun beachte man noch dazu die Vorteile, die sich bei diesem Verfahren dadurch ergeben, daß der Käse fetter ist und daher weniger dem Grünwerden unterliegt (zwei Eigenschaften, welche die Firma Carlo Cattaneo & Iglia aus Pavia, die Ankäuferin der Produktion der Meierei Uggeri, durch wiederholte Untersuchungen und Vergleiche Gelegenheit gehabt hat zu kontrollieren und anzuerkennen), und man wird sicherlich zu dem Schluß kommen, daß das neue Verfahren das volle Vertrauen der Produzenten von Granakäse verdient.

* * *

Einen weiteren beachtenswerten Vorzug bietet also die Verkürzung des Aufrahmens in den Satten, wofern Kupfersatten angewandt werden, dadurch, daß das Grünwerden des Käses im Schnitt verhindert wird.

Dieses Grünwerden macht ebenfalls eine Sorge des Produzenten aus, da es die Ursache eines starken Sinkens im Preise beim lombardischen Grana ist. In einem unserer im Bull. Uffic. del Ministero di Agricolt. veröffentlichten Berichte (s. Berichterstattung über das Jahr 1904—1905) ist gezeigt worden, und zwar stets durch streng vergleichende Prüfungen¹⁾, was für einen Einfluß das Stehen der Milch in den Kupfersatten gegenüber dem Stehen derselben in sonstige Satten in der Hinsicht hat, daß er das obenerwähnte Grünwerden hervorruft. Dieses steht in Beziehung zu der Quantität Kupfer, die die Satten an die Milch abgeben. Durch die Einwirkung der Säure, die durch die Entwicklung der Mikroorganismen hervorgebracht wird, und da in der Regel die Säuerung der Milch um so stärker ist, je länger das Stehen der Milch andauert, so wird, wenn man das Stehenbleiben verkürzt, die Quantität Kupfer, die von der Milch aufgenommen wird, immer geringer; infolgedessen vermindert sich auch immer mehr die Gefahr des Grünwerdens des Käses.

Die Erörterung über das Kupfer und das hierdurch bewirkte Grünwerden des Käses führt zu einer weiteren Bemerkung. In Anbetracht des unbewegten

¹⁾ Man beachte, daß die Gesellschaft „Pro Grana“ als die erste es unternommen hat, die streng vergleichende, auf wissenschaftlicher Grundlage beruhende Methode anzuwenden, sowohl um die Wirkung der Reinkulturen zu untersuchen, als auch um genau den Einfluß der Satten auf die Färbung des Grana zu bestimmen. Zu diesem Zweck hielt sie es für erforderlich, eine solche Anzahl von Kesseln und eine solche Milchmenge in Anspruch zu nehmen, daß sich wenigstens zwei normale Käse gleichzeitig, mit derselben Qualität und Quantität von Milch, Saffran, Lab usw. fabrizieren ließen.

Hierbei wechselte man nur mit Satten von verschiedener Beschaffenheit, während man jede Ungleichheit in den anderen Faktoren (in den Futtermitteln, dem Fettgehalt der Milch, der Safranmenge usw.), die auf die Färbung des Käses einwirken können, ausschloß. Also, solche wirklich vergleichende, unstreitbar beweisende Prüfungen sind von der Gesellschaft „Pro Grana“ vorgenommen worden, indem sie die Vergleiche mit Satten aus blankem Kupfer, aus dunklem Kupfer, aus verzinnem Eisen und aus Aluminium anstellte (s. Boll. uffic. del Ministero di Agricoltura. 1905).

Zustandes, in dem die Milch in den Satten verbleibt, ist es einleuchtend, daß die Abgabe von Kupfer an die Milch genau genommen in den Milchsichten vor sich geht, die sich in direkter Berührung mit der Fläche der Satten befinden. Nun pflegt man in den Kessel die ganze in den Satten enthaltene Milch, die ganze, bis zum letzten Tropfen, zu schütten, wobei man sogar mit den Händen (wo bleibt da die Hygiene!) nachhilft, um den Boden der Satten von den haftengebliebenen Milchresten zu befreien. Es sind aber gerade diese letzten Partien, diese Reste, am längsten mit dem Kupfer in Berührung geblieben und enthalten deswegen das Kupfer in größerer Menge. Auch über diesen Punkt sind wir imstande, Daten zu bieten.

In einer andern Meierei, die unsere Methode befolgt (die Meierei Longora der Gebrüder Stabili, wo der andere der beiden, bei dem oben erwähnten Wettbewerb ausgezeichneten Käser tätig ist) hat man schon angefangen, die letzten Milchpartien der Satten (etwas weniger als 1 l pro Satte, d. h. ungefähr 1 l auf 50 l Milch) zurückzuhalten, indem man nur die Masse der darüberstehenden Milch in den Kessel füllt. Es wurden nun Proben von den beiden Milchmengen an die „Kgl. Station für landwirtschaftliche Chemie“ in Mailand zur Analyse geschickt, und es ergab sich, daß, während die Masse der Milch in dem Kessel kaum ein Milligramm Kupfer pro Liter enthielt, die Milch vom Boden der Satten 7 mg pro Liter aufzuweisen hatte! Also siebenmal so viel! Es ist also klar, daß es genügen wird, diese letzten Bruchteile Milch nicht in den Kessel zu schütten, sondern sie auf dem Boden der Satten zu belassen, um die Neigung des Käses zum Grünwerden erheblich zu vermindern. Diese Restmilch, welche, wie ich wiederhole, nicht mehr als 2 l pro Hektoliter ausmacht, kann man ja hernach zugleich mit den Molken entrahmen, um das wenige Fett, welches sie noch enthält, auszuziehen, und sie sodann für die Schweine bestimmen.

* * *

Alles das, was wir über das Grünwerden dargelegt haben, betrifft nicht den emilianischen oder Reggianer Grana, da, wie bekannt, in der Emilia nicht Kupfersatten (*bacinelle*), sondern Holzbütten (*mastelle*) benutzt werden, weswegen der emilianische Grana, zum Unterschiede vom lombardischen Grana, nicht grün im Schnitt wird. Aber auch hinsichtlich der Behandlung dieser Bütten ist etwas anzuempfehlen, was wiederum für die hygienische Behandlung spricht.

Während des Stehens der Milch in den Bütten geht ja eine Vermehrung der in der Milch enthaltenen Keime vor sich, wodurch die Reifung der Milch bewirkt wird. Um diese Reifung zu fördern, pflegt der Käser nicht nur die Dauer des Stehenbleibens der Milch möglichst lange auszudehnen, sondern auch die sogenannte „Kraft“ (*Forza*) der Bütten zu Hilfe zu nehmen. Diese „Kraft“, die ich lieber „Schmutz“ nennen möchte, besteht, wie eine gründliche Untersuchung zeigt, aus einer Masse von Mikroben, denen man es absichtlich vom einen Male bis zum andern gestattet, die Wände der Holzbütten zu bedecken und in dieselben einzudringen. Nun lassen es doch die Erwägungen hinsichtlich der Hygiene notwendig erscheinen, auf die „Kraft“ der Bütten zu verzichten, sowie das Stehenbleiben der Milch möglichst abzukürzen, weil sich unter diesen Mikroben auch Keime befinden können, die dem guten Gelingen des Käses nachteilig sind.

Ich weiß es, wie schon oben gesagt habe, daß zur Herstellung des Grana die Milch einen gewissen Grad an Säure haben muß, wie eine solche gerade

durch die Gärungserregung der Mikroben hervorgerufen wird. Warum sollen wir aber diese Säuerung dem Zufall, d. h. der empirischen Übung, überlassen, wenn wir sie durch rationelle Mittel erreichen können? Zahlreiche Arten von Keimen gibt es, die imstande sind, die Milch zu säuern, und zu denselben gehören auch solche, die zu den Verderbern des Käses gehören. Warum sollen wir Gefahr laufen, daß die erwartete Säuerung der Milch von diesen dem Käse nachteiligen Keimen hervorgerufen wird, die wir in den Bütten sich entwickeln lassen, wenn wir die Möglichkeit haben, die Säuerung im Kessel mit Hilfe von sicherlich guten, eigens präparierten Reifungserregern zustande zu bringen?

Ich werde hier kurz wiederholen, was ich in bezug zu dem lombardischen Granakäse gesagt habe.

Die Milch sollte nur so lange und unter so günstigen Bedingungen in den Bütten verbleiben, daß diejenige Rahmmenge aufsteigt, die für einen angemessenen Butterertrag erforderlich ist, und derjenige Grad des Magerseins der Milch sich ergibt, den man zur Herstellung des Grana für nötig erachtet. Es ist nicht von Wichtigkeit, daß die Milch noch nicht reif oder ungesäuert, wie man sagen mag, in den Kessel gefüllt wird; ihre Reifung kann in dem Kessel infolge der Zufügung der Reinkulturen vor sich gehen, welche bei der Temperatur des Gerinnens und der Verarbeitung der Milch den zu einer schnellen Entwicklung geeigneten Bedingungen ausgesetzt sind.

Indem man die Dauer des Stehenbleibens der Milch in den Bütten verkürzt, entgeht man auch der Gefahr, daß man die Milch zu mager werden läßt und infolgedessen, ohne es zu wollen, einen nicht genügend fetten Grana herstellt. Das Fett, welches dann in größerer Menge in den Molken zurückbleibt, läßt sich durch Zentrifugieren der Molken wiedergewinnen und zu Molkenbutter verarbeiten, welche, wenn sie gut hergestellt ist und von einem mit Reinkulturen behandelten Käse her stammt, der Butter aus Rahm nicht besonders nachsteht.

Hinsichtlich der „Kraft“ der Bütten haben wir schon bemerkt, daß man sie aufgeben muß, indem man sie durch Reinkulturen ersetzt. Zu diesem Zweck muß man die Bütten mit kochendem Wasser reinigen, um jedesmal Milch- und Schmutzreste zu entfernen; es empfiehlt sich auch, statt der Holzbütten Satten aus verzinnem Eisenblech oder einem sonstigen, nicht absorbierenden Material anzuwenden.

In bezug auf die hygienische Behandlung sind noch zwei Bemerkungen zu machen.

Die eine betrifft das Erfordernis, die Milch in den Bütten oder Satten zur Aufrahmung in einem besondern Raume, in einer eigentlichen *Milchkammer*, wie solches bei der Käsebereitung in der Lombardei Gebrauch ist, und nicht in der Küche der Meierei aufzustellen, wo die Milch jeder Art von Verunreinigung ausgesetzt ist.

Die andere Bemerkung betrifft die üble Gewohnheit, die Bütten oder die Satten, die die Milch enthalten, übereinander aufzustellen. Dies geschieht offenbar wegen Raum mangels, aber man beachtet dabei nicht, daß die Bütten und Satten durch schmutzige Hände gehen, oft auf den Fußboden gesetzt oder in verschiedenen Räumen hingestellt werden, die durchaus nicht rein sind! Nichts ist also natürlicher, als daß, wenn die Bütten übereinander aufgestellt werden, die an den äußern Flächen haftenden Unreinlichkeiten der obern Bütten oder Satten in diejenige Milch gelangen, die in den untern enthalten ist. Man muß daher sorgen, daß die Milchkammer geräumig genug

sei, um alle Aufräumungsbehälter aufzunehmen, so daß man nicht genötigt ist, sie übereinander zu stellen.

Wie man sieht, besteht die hygienische Behandlung aus mancherlei Faktoren, von denen einige unwichtig erscheinen mögen, während sie doch einige Bedeutung haben, um die Wirkung der guten Keime zu fördern. Man muß wohl bedenken, daß es nicht gelingt, alles durch einige Liter Molken oder durch die Bestimmung des Säuregrades oder auch durch ein Gläschen Reinkultur wieder gut machen zu wollen.

Nur dann, wenn wir infolge der hygienischen Maßnahmen uns eine Milch verschafft haben, die möglichst frei von schädlichen Keimen ist, können wir mit Nutzen die Mittel anwenden, die die moderne Technik der Käsebereitung uns an die Hand gibt, und so die Fabrikation des Käses verbessern.

Zusammenfassung.

Die Tätigkeit der „Gesellschaft Pro Grana“ stützt sich auf die beiden Anforderungen: Reinkulturen und hygienische Behandlung der Milch.

Während eines Zeitraums von neun Jahren ist durch Untersuchungen im Laboratorium, durch praktische, auf wissenschaftlicher Grundlage ausgeführte Versuche, durch Anwendung im großen Maßstabe, durch Belehrung in sicherer Weise nachgewiesen worden:

1. Der Nutzen der Anwendung der Reinkulturen von Milchsäurebakterien bei der Käsebereitung (bei der Fabrikation des Grana und anderer Käse).

2. Die Notwendigkeit, die Anwendung der Reinkulturen mit der hygienischen Behandlung der Milch zu verbinden.

Die verhältnismäßig noch beschränkte Anzahl der Meiereien, die seit mehreren Jahren das von uns ausgearbeitete Verfahren endgültig eingeführt haben, mag allerdings schon hinreichend für die Anwendbarkeit und den Nutzen dieses Verfahrens sprechen; sie deutet aber auf die großen Schwierigkeiten hin, die der richtigen Anwendung desselben noch im Wege stehen. Die Schwierigkeiten beruhen darauf, daß, während die eine der beiden Anforderungen, die Anwendung der Reinkulturen, zu weitgehender Verbreitung gekommen ist, da sie nunmehr die einmütige Anerkennung der Käsefabrikanten gefunden hat, die zweite Anforderung, die hygienische Behandlung, von welcher die Anwendung der Reinkulturen wesentlich abhängt, noch nicht nach ihrem Wesen und ihrer Wichtigkeit begriffen worden ist.

Die Tätigkeit der „Gesellschaft Pro Grana“ muß deshalb auch in Zukunft und zwar in verstärktem Maße darauf gerichtet sein, die Bedeutung der hygienischen Behandlung noch weiter klarzulegen und festzustellen.

Zur Erreichung dieses Zieles möchte ich auf Grund der von mir gemachten Erfahrungen einige Normen für die Fabrikation des Granakäses anempfehlen, welche, während sie die Anwendung der Reinkulturen und die Beachtung der hygienischen Behandlung erfordern, zugleich die hauptsächlichsten Wünsche des Produzenten des Granakäses befriedigen, Normen, welche, während sie den Käser von der Sorge um die Reifung der Milch vor der

Einfüllung derselben in den Kessel befreien, ihm den Antrieb und die Rechtfertigung zur Herstellung von mageren und nicht lebensfähigen Käsen nehmen und ihn in die Lage versetzen, neben einer angemessenen Quantität Butter, auch einen angemessenen fetten und angemessenen lebensfähigen Käse zu bereiten.

Man wolle ferner beachten, daß es nur nach Anwendung eines solchen Fabrikationsverfahrens möglich sein wird, das so sehr gewünschte Prinzip, Granakäse in den Handel bloß nach seinem Fettgehalt zu bringen und im Handel zu verlangen, zur Geltung zu bringen, ein Prinzip, das sich heute in der Praxis noch nicht durchführen läßt und zwar wegen der großen Verschiedenheit des Fettgehalts des Käses, welche durch die Jahreszeiten und durch andere Faktoren, auch unabhängig von dem Willen des Produzenten, bedingt wird.

Das Verfahren, welches ich anempfehle, beruht auf folgenden Hauptpunkten:

1. Es ist dafür zu sorgen, daß die hygienische Produktion der Milch (resp. die Ernährung des Milchviehs), sowie das Melken, das Ansammeln und das Aufbewahren der Milch in einer Weise zustande kommt, daß die Verunreinigung der Milch durch dem Käse schädliche Keime verhindert wird.

2. Es ist das Stehenbleiben der Milch in den Satten oder Bütten in der Weise zu regeln, daß allerdings das Aufsteigen einer angemessenen Quantität Rahm (ungefähr 50 Proz.) ermöglicht, aber die Vermehrung der Mikroflora der Milch beschränkt wird (eventuell durch die Abkühlung der Milch, namentlich im Sommer).

3. Es ist durch Zufügung von Reinkulturen in den Kessel die Reifung der Milch und des Quargs während der verschiedenen Phasen der Bearbeitung (des Gerinnens, der Perioden des Abwartens, des Kochens, des Aufrührens, des schließlichen Warmbades) zu fördern.

*

*

*

Diese Vorschläge bildeten den Gegenstand einer eingehenden und lebhaften Diskussion bei einer Tagung von Käseereiinteressenten, welche im vergangenen März in Mailand bei der „Landwirtschaftsgesellschaft für die Lombardei“ stattfand und an welcher zwölf landwirtschaftliche Wanderlehrstühle, zahlreiche landwirtschaftliche Genossenschaften, Handelskammern, Professoren des Molkereiwesens, der Chemie und der Landwirtschaft, Abgeordnete und Senatoren von der landwirtschaftlichen Partei, sowie viele Landwirte, Käseproduzenten und Käsegroßhändler usw. teilnahmen. In dieser Versammlung wurde folgender Tagesordnung zugestimmt:

„Die Teilnehmer an der öffentlichen Versammlung, die von der Genossenschaft „Pro Grana“ auf den 16. März 1912 bei der „Landwirtschaftsgesellschaft für die Lombardei“ anberaumt ist, sprechen, nachdem sie den Bericht von Prof. Dr. Costantino Gorini gehört haben, der Tätigkeit und dem Programm der genannten Genossenschaft, welche beide sich auf die vereinigte Anwendung der Reinkulturen und der hygienischen Maßnahmen stützen, ihre Anerkennung aus und empfehlen den Landwirten und den Produzenten von Granakäse die Weisungen jener Genossenschaft zur Verbesserung dieses so hervorragenden und geschätzten Käses zu befolgen.“

Nachtrag.

Wegen näherer Auskunft über die Sache möge man sich wenden an die Firmen **Cattaneo e Varasi** in Pavia, **Mangiarotti** in Lomello, **Locate-Triulzi** bei Mailand, **Barberi** in Turin, an die Häuser **Stabilini** in Carpiano, **Vigoni** in Secugnago, **Ferrari** in Fombio, an die Genossenschaftsmolkereien in Soresina (Cremona), in Gageano (Milano), an die landwirtschaftlichen Wanderlehrstühle zu Sondrio, Bergamo, Udine usw.

Folgendes sind die Quantitäten von Reinkulturen, die von der Gesellschaft „Pro Grana“ in den sechs Jahren von 1906—1911 geliefert wurden (jede Dosis dient zur Verarbeitung von etwa 5 Hektoliter Milch):

Im Jahre	1906	verabfolgte Dosen,	Anzahl	2 276
„ „	1907	„ „	„	6 449
„ „	1908	„ „	„	6 261
„ „	1909	„ „	„	6 564
„ „	1910	„ „	„	12 114
„ „	1911	„ „	„	11 609 ¹⁾

Gesamtbetrag der Dosen in den 6 Jahren:

Anzahl 45 273

Diese Reinkulturen werden zum Selbstkostenpreis an jedermann, an Genossen oder Nichtgenossen der Gesellschaft „Pro Grana“ abgegeben. An die wissenschaftlichen Institute und an die Landwirtschaftlichen Wanderlehrstühle, welche sie zu erproben wünschen, werden sie kostenlos oder zu einem ermäßigten Preise, je nach der verlangten Quantität, verabfolgt, so daß sie zur öffentlichen Benutzung stehen.

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Kenntnis der niederen pflanzlichen Organismen, besonders der Bakterien, von Hoch- und Niedermoor- in floristischer, morphologischer und physiologischer Beziehung von Dr. Georg Albert Ritter.

Kurze Berichtigung

von Hjalmar von Feilitzen.

In seiner obigen, in dieser Zeitschrift Bd. 34. 1912. No. 23/25 veröffentlichten Arbeit hat der Verf. in der kritischen Literaturübersicht auch die von mir und **Fabrics** seinerseits ausgeführte Untersuchung (diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 161—168) kurz berührt.

Er scheint aber nicht die Originalarbeit richtig durchgelesen zu haben, denn nach der Wiedergabe der Keimzahlen, teilt er folgende, für uns überraschende Zeilen mit.

„Die Keime wurden fast ausschließlich in den oberen 15—20 cm Tiefe getroffen. Bei 50 cm Tiefe wurden alle Platten, nur 1 ausgenommen, steril befunden. Indes wirft auch **Löhnis** den beiden Autoren vor, daß die

¹⁾ Die kleine Abnahme beruht auf der geringeren Quantität Milch, die wegen ihres erhöhten Preises von dem einen und andern der regelmäßigen Konsumenten im Jahre 1911 verarbeitet wurde.

Zählzeit zu kurz bemessen war, so daß diese bezüglichlichen Angaben wohl nur einen beschränkten Wert beanspruchen dürfen.“

Damit ist unsere Arbeit einfach abgetan.

Mit dieser Sache verhält es sich aber folgendermaßen:

In unserer Arbeit haben wir in der Einleitung (p. 161) eine Arbeit von A. Stålström referiert, worin er als Punkt 5 seiner Schlüsse schreibt: „Die Mikroorganismen kommen beinahe ausschließlich in der oberen, 15—20 cm mächtigen Schicht vor. Schon bei 50 cm waren alle Proben (mit einer Ausnahme) steril. Dazu mag noch erwähnt werden, daß diese Sterilität nicht immer konstant blieb. Nach 5—6 Tagen traten auch in den vorher sterilen Kulturen Bakterienkolonien auf. Die Zahlen beziehen sich also auf 40—48 Stunden nach der Herstellung der Kulturen.“

Dazu fügten wir folgende Bemerkung: „Nach unserer Ansicht eine allzu kurze Zeit.“

F. Löhnis referiert das in seiner Landw. Bakteriologie. p. 511. Note 6 folgendermaßen:

„Stålström (Finska Mosskulturföreningens årsbok 1898. fr. 44—64 zit. nach Fabricius und Feilitzen, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. 1905. p. 161) fand die Keime ausschließlich in den oberen 15—20 cm. Bei 50 cm Tiefe wurden alle Platten mit einer Ausnahme steril befunden. (Doch erscheint die Zählzeit zu kurz bemessen!)“

Herr Dr. Ritter scheint die Löhnissche Bemerkung gelesen, den Verfasser Stålström mit den Referenten seiner Arbeit verwechselt zu haben, und von da ab war es ja ein leichtes, unserer Untersuchung den Wert abzusprechen.

Eine solche „kritische Literaturübersicht“ konnte ich nicht unerwidert lassen.

Nachdruck verboten.

Die Salze Zn, Mg und Ca, K und Na und ihr Einfluß auf die Entwicklung von *Aspergillus niger*.

[Aus dem Laboratorium für Pflanzenphysiologie und Bakteriologie des Landwirtschaftlichen Instituts Moskau.]

Von J. Buromsky.

Die Entwicklung der Lehre über die Reizstoffe, welche auf die verschiedensten chemischen Prozesse und Lebensprozesse einwirken, lenkte die Aufmerksamkeit der Forscher mehr und mehr auf die Frage des Einflusses der Salze von schweren Metallen — Zn, Fe, Ni, Co, Cu u. a. Zu gleicher Zeit wurden auch die Elemente der sogenannten aschenhaltigen Gruppe der Metalle, wie K und Mg, berührt; die Notwendigkeit, daß dieselben im Nährsubstrat enthalten sein müßten, wurde bezweifelt, da in den ersten Rezepten des künstlichen Substrats, entweder einfach unnütze Verbindungen, wie z. B. Weinsäure im Beisein von Rohrzucker, waren, oder es wurden Elemente gefunden, welche vom Standpunkte der direkten Ernährung für unnütz gehalten wurden und nur für gewisse Prozesse und Erregungen dienten. Als Repräsentant für schwere Metalle, dessen Salze im alten Rezept des Substrats für Pilze enthalten, erwähnt er Zn. Der Autor dieses Rezeptes war Raulin.

R a u l i n¹⁾ hält Zn für einen unumgänglichen Bestandteil des Substrates für Pilze. Er rät, auf 3 l Nährflüssigkeit 0,1—0,16 g Zn OS₄ hinzuzufügen, also im Mittel 0,004 Proz. ZnSO₄. In den darauffolgenden Arbeiten von M o l i s c h²⁾, B e n e c k e³⁾, P f e f f e r⁴⁾, R i c h a r d⁵⁾ u. a. wurden die Salze der schweren Metalle und die Salze von Zn nur als Reizstoffe betrachtet.

Die Arbeiten von N. O n o⁶⁾ und R i c h t e r⁷⁾ bestätigen diese Ansicht. Außer der Vergrößerung des Trockengewichts des Myceliums weist N. O n o noch auf den ökonomischen Koeffizienten hin⁸⁾.

Nach K o s i n s k y wird durch den Zusatz von ZnSO₄ die Qualität des sich ausscheidenden CO₂ vergrößert; aber außer CO₂ hat es weder das Gewicht des Pilzes, noch den konsumierten Zucker bestimmt⁹⁾.

In meiner Arbeit stellte ich mir die Aufgabe, den Einfluß der Konzentration von ZnSO₄ zu erforschen, nämlich seinen Einfluß erstens auf die Bildung des Stoffes des *Aspergillus niger*, zweitens auf den Stoffwechsel, das Ausscheiden von CO₂ und C₂O₄H₂ und den Verbrauch von Zucker. Besondere Aufmerksamkeit mußte auf die Reinheit der Präparate, welche zu dem Nährsubstrate gehören, und auf die Geschirre, in welchen die Pilze kultiviert wurden, gerichtet sein.

Das destillierte Wasser wurde noch einer zweifachen Destillation in Glasgeschirren unterworfen, wobei das erstemal K₂MnO₄ und SO₄H₂ und das zweitemal Na(OH) hinzugesetzt wurden. Alle Salze und der Rohrzucker wurden aus solchem zweifach destilliertem Wasser auskristallisiert.

Zu den Kulturen wurden flache Gefäße von einem Inhalt von 1330 ccm gebraucht. In jedes Gefäß wurden nur 220 ccm Flüssigkeit gegossen, und da dieselben sehr breit waren, so erreichte die Flüssigkeit nur die Tiefe von 1 cm, hatte eine große Fläche und eine Menge Luft über derselben, was bei andauernden Kulturen sehr notwendig ist.

Die Kolben wurden mit hygroskopischer Watte verkorkt und im K o c h - schen Apparat zweimal je eine halbe Stunde mit einer Zwischenzeit von 24 Stunden sterilisiert.

Es wurde eine große Anzahl von Sporen ausgesät, um die Saat nach Möglichkeit auszugleichen.

Alle Versuche wurden im Dunkeln bei einer Temperatur von 29—30° C angestellt. Nach Beendigung der Versuche wurde die Pilzdecke in dem Kolben durch eine große Quantität gewöhnlichen destillierten Wassers solange gespült, bis das Filtrat nicht mehr trübe war von BaCl₂, und mit Salzsäure angesäuert.

Getrocknet wurde bis zum beständigen Gewicht im Trockenschrank bei 60° C. Als Nährsubstrat wurde dasselbe gebraucht wie von P f e f f e r (1895. Jahrb. f. Wiss.), R i c h a r d und N. O n o, da derselbe die beste Entwicklung der Pilze sichert; nur NO₃NH₄ wurde durch SO₄(NH₄)₂ ersetzt und nur zur Kontrolle wurden auch Versuche mit NO₃NH₄ angestellt.

Der Gehalt des Nährsubstrats war folgender:

KH ₂ PO ₄	0,50 g	KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g	MgSO ₄	0,25 g

¹⁾ Annal. natur. Sér. V. T. XI. 1869. p. 243—54.

²⁾ 1892.

³⁾ Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 28. 1895.

⁴⁾ Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 28. 1895.

⁵⁾ Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 30. 1897.

⁶⁾ Journ. Col. Sci. Imp. Univ. Tokyo. Vol. XIII. Part. I. 1900.

⁷⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901.

⁸⁾ P f e f f e r, Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 28. p. 257; K u n s t m a n n, Verh. zwischen Pilzernte und verbrauchter Nahrung. [Dissert.] Leipzig 1895.

⁹⁾ K o s i n s k i, Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 37. 1902.

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	1,0 g	NO_3NH_4	1,0 g
FeSO_4	Spur	FeSO_4	Spur
Rohrzucker	5,0 g	Rohrzucker	5,0 g
Wasser	100 ccm	Wasser	100 ccm

Der beobachtete Pilz war der allergewöhnlichste — *Aspergillus niger*.

Wir wollen mit den Versuchen, bei welchen sich die Pilze auf dem Substrat mit $\text{SO}_4(\text{NO}_4)_2$ entwickelten, anfangen.

Versuche mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Vor allem wollen wir uns bei dem Einflusse von ZnSO_4 auf das Keimen der Konidien und die Fruchtbarkeit der Pilze aufhalten. Die Sporen keimten schon am nächsten Tage auf dem Substrate mit und ohne Zn, und bildeten weiße, flockige Punkte — Kolonien — auf der Oberfläche des Substrats, die mit bloßem Auge gut sichtbar waren. Die Konidien zeigten sich bei Zn in folgender Reihenfolge:

Kulturen	— ZnSO_4	+ ZnSO_4
Bei 30° C	nach 3—4 Tagen	nach 7—8 Tagen
„ 20° C	„ 5—6 „	„ 12 „

D. h., daß wie bei erhöhter Temperatur, so auch bei Stubentemperatur Zn die Entwicklung der Sporen zurückhält. Im normalen Substrat erscheinen die Sporen doppelt so rasch, als wenn man Zn zusetzt. Außerdem ist noch zu bemerken, daß im Substrat mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sich die Sporen immer bildeten, sogar bei Zusatz von 0,1 Proz. ZnSO_4 . (Richard erhielt sterile Kulturen schon bei 0,033 Proz. ZnSO_4 , aber sein Substrat enthielt NO_3NH_4).

Die Konidien erschienen gleichzeitig in allen Kolben mit Zn, ungeachtet der Konzentration. Die Konidien, welche sich bei Zusatz von Zn entwickelten, hatten eine etwas hellere, bräunliche Färbung und waren in geringerer Anzahl, im Vergleich mit den Kulturen ohne Zn, vertreten. Bei dauernderer Kultur entwickelt der Pilz Konidien im Normalsubstrat, die Konidien keimten und gaben eine neue Mikaliumschicht, und auf derselben zuweilen neue Konidien, so daß die Pilzdecke mehrschichtig war.

Bei Zusatz von Zn erhielt das Substrat eine orange-bernsteingelbe Färbung, ohne Zn war es hellgelb. Die untere Schicht von *Aspergillus niger* war zuweilen auch bei Zusatz von Zn gelb gefärbt. Die Färbung wurde intensiver bei Vergrößerung des Prozentes von ZnSO_4 . Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß die gelbliche Färbung abhängig ist von der Färbung der Pilzhypen. Die Hypen mit gelber Färbung waren größer in ihrem Umfange als diejenigen mit farblosen Hypen in demselben Mycelium.

Das Mycelium bleibt locker und elastisch und unterscheidet sich von dem Mycelium, welches sich bei Zusatz von Zn entwickelt hat und welches sehr trocken und bröcklig wird. Diese Eigenschaften nehmen bei größerer Konzentration von Zn zu, so daß man schon daraus schließen kann, unter welchen Bedingungen sich der Pilz entwickelt hat. Bei einem Zusatz von 0,001 Proz. ZnSO_4 zu Zn vergrößert sich schon die Trockenmasse des Pilzes um das Doppelte. Bei fernerer Erhöhung des Prozentsatzes von ZnSO_4 vergrößert sich das Gewicht nur sehr allmählich. Man kann annehmen, daß die Konzentration von 0,1 Proz. Zn die größte ist, welche keine Vergrößerung des Gewichts des Pilzes hervorruft und schon die Grenze bildet, nach der

die Zn-Salze schlecht oder sogar giftig einwirken. Richter beobachtete in der Tat, daß bei einem Zusatz von 0,16 Proz. die Sporen von *Aspergillus niger* nicht keimten.

Daraus ersehen wir, daß die Zn-Salze in den Grenzen von 0,001 Proz. bis 0,1 Proz. quantitativ fast ganz egal auf die Entwicklung des Pilzes und auf seine Lebensfunktionen einwirken, und dieses ist ein Beweis zugunsten des Zn, als Repräsentanten einer ganzen Reihe von Reizstoffen, die die Reaktion begünstigen, welche aber nur in minimalen Quantitäten zugefügt zu sein brauchen. Zu gleicher Zeit wurden Versuche zur Bestimmung des ökonomischen Koeffizienten angestellt, und zwar auf folgende Weise:

Dickwandige Kolben zum Absaugen unter Druck wurden nicht zu fest mit hölzernen Pfropfen versehen, in welche in Watte gewickelte Glasröhren eingefügt waren. Die Pfropfen waren ebenfalls in Watte gehüllt. Der Kolbenhals und die Röhren wurden mit Kautschuk ausgekleidet, welcher seinerseits wieder mit 20 cm langen Glasröhren versehen war; die letzteren wurden mit Watte verstopft. In jeden Kolben kamen 200 ccm der Lösung. Nach der Sterilisation wurden die Kolben infiziert und die Röhren derart aufgestellt, daß sie ca. 2 cm über der Oberfläche der Flüssigkeit standen, damit die Pilzdecke nicht durch einen Luftzug zerrissen würde. Sodann wurde der Pfropfen mit Mastix (Siegelack und Terpentin) verschlossen und nach der Abkühlung der Kolben wurden die mit Watte zugestopften Röhren mit einer Luftpumpe in Verbindung gebracht, welche ununterbrochen arbeitete. Um die Luft von CO_2 zu befreien, wurde sie zuerst durch den Baboschen Kaliapparat mit Ätznatron durchgelassen.

So wurde bei den Versuchen bei Stubentemperatur verfahren. Bei einer Temperatur von 30°C wurde, um das Verdunsten des Wassers bei dem Pumpen zu verhüten, zwischen den Baboschen Kaliapparat und dem Kolben mit den Pilzen noch ein anderer Kaliapparat mit destilliertem Wasser eingestellt.

Die Kolben mit den Pilzen und der Kaliapparat mit dem Wasser standen in einem Wasserthermostaten, aus welchem die Kautschukröhren nach außen führten. Bei all diesen Versuchen war die Konzentration von Zn = 0,1 Proz. ZnSO_4 .

Die Forschungen von Kosinski¹⁾ zeigten, daß ein Zusatz von ZnSO_4 zu den Kulturen von *Aspergillus niger* bis zu verschiedenen Konzentrationen die Quantität der CO_2 nicht änderte. N. Ono²⁾ bestimmte den ökonomischen Koeffizienten bei verschiedenem Prozentgehalte ZnSO_4 im Substrate; sie waren alle gleich.

Aus diesem und auch noch aus dem anderen Grunde schon früher bei dem Einflusse von Zn in verschiedener Konzentration auf die Wachstumsenergie erwähnten blieb ich bei 0,1 Proz. ZnSO_4 stehen, weil ich 0,1 Proz. für das Maximum halte, bei welchem die maximale Ernte erhalten werden kann. Aus diesem Grunde war es interessant, den Einfluß von Zn auf den Stoffwechsel unter diesen Bedingungen zu beobachten.

Die Qualität von CO_2 wurde in einigen Fällen täglich bestimmt, in anderen summarisch während der ganzen Dauer der Versuche.

Die Temperatur betrug 30°C und die Stubentemperatur $19-21^\circ \text{C}$.

¹⁾ Jahrb. f. wiss. Bot. 1902. p. 37.

²⁾ Journ. Col. Sci. Imp. Univ. Tokyo. Vol. XIII. Part. I. 1900.

Die Atmungskoeffizienten und die ökonomischen Koeffizienten geben folgendes Bild:

		Atmungskoeffizient = $\frac{\text{CO}_2}{\text{die Ernte}}$			
		t° 30° C		t° 20° C	
		— Zn + 0,1% ZnSO ₄		— Zn + 0,1% ZnSO ₄	
Atmungskoeffizient		1,7	2,8	Atmungskoeffizient	3,3
„		1,3	1,9	„	4,4
„		2,2	2,3	„	2,6
Mittlerer Atmungskoeffizient		1,8	2,4	Mittlerer Atmungskoeffizient	2,8
					3,5

Tabellen für ökonom. Koeffizient:

Tabellen für ökonom. Koeffizient:			Zucker		
			Gewicht des Pilzes		
t° 30° C			t° 20° C		
— Zn + 0,1 % ZnSO ₄			— Zn + 0,1% ZnSO ₄		
Ökonom. Koeffizient für 7 Tage	4,3	2,9	Ökonom. Koeffizient für 17 Tage	6,2	2,9
Ökonom. Koeffizient für 10 Tage	2,9	2,9			
Ökonom. Koeffizient der Versuche mit Mg für 7 Tage	3,6; 3,6	—			
Auch für 7 Tage	3,5; 3,5	—			
Mittlerer ökonom. Koeffizient	3,6	2,9			

Aus den Tabellen für die Atmungskoeffizienten ersieht man, daß Zn nicht nur das Wachstum befördert und das Trockengewicht des Pilzes vergrößert, sondern auch die Atmungsenergie von 1,8 im Mittel bis auf 2,4 bringt. Bei 1 g Trockengewicht des Pilzmyceliums erhalten wir bei der Kultur ohne Zn 1,8 g CO₂, aber mit Zn 2,4 g bei 30° C. Bei 20° C erhöht sich der Koeffizient von 2,8 im Mittel bis auf 3,5. Bei länger dauernden Kulturen unterscheidet sich der Atmungskoeffizient weniger als bei jungen Kulturen. Es ist wahrscheinlich, daß unter gewissen Umständen die Koeffizienten vollkommen ausgeglichen werden können.

Eine entgegengesetzte Wirkung auf die Atmung übt die Temperatur aus. Bei Erhöhung der Temperatur von 20° auf 30° C fällt trotz des verstärkten Wachstums (wie mit Zn) der Atmungskoeffizient von 2,8 auf 1,8, wenn Zn fehlt, und von 3,5 bis auf 2,4, wenn Zn vorhanden ist. D. h. unabhängig vom Einfluß des Zn wird in beiden Fällen der Koeffizient um 1,0 verringert; die Temperatur von 30° C ist bedeutend günstiger. Bei einer Temperatur von 30° findet trotz der Zunahme des Gewichts ein geringerer Zuckerverbrauch statt und überhaupt eine bessere Ausnutzung der verbrauchten Hydrate was man auch aus den Tabellen für die ökonomischen Koeffizienten ersieht. Bei 30° C verbraucht 1 g Trockenmasse des Pilzes 4,3—2,9 g Zucker, bei 20° C wird dieser Verbrauch auf 6,2 g gesteigert. Ein Blick auf die Tabellen für die Atmungskoeffizienten könnte zu dem Schluß führen, daß Zn, indem es die Atmung befördert, den Pilz zwingt, den Zuckerverbrauch auf dieselbe Quantität Trockengewicht zu vergrößern und somit auch den ökonomischen Koeffizienten zu erhöhen. Aber in der Tat trifft das nicht zu. Aus den Tabellen für die ökonomischen Koeffizienten ist ersichtlich, daß die Koeffizienten bei Zusatz von Zn bei einer Temperatur von 30° C von 4,3 und bei einer Temperatur von 20° C von 6,2 bis auf 2,9 herabgesetzt werden. Bei den darauffolgenden Versuchen, die später besprochen werden sollen,

waren die ökonomischen Koeffizienten in Normalsubstraten meist gleich 3,6. Daraus ersehen wir, daß Zn das Wachstum beschleunigt und das Trockengewicht vergrößert, die Atmung erhöht, zu gleicher Zeit aber auch einen ökonomischeren Verbrauch der Nährstoffe vermittelt.

Da der ökonomische Koeffizient trotz des intensiveren Atmens herabgesetzt wird, kann man daraus den Schluß ziehen, daß bei Erhöhung der Atmungsenergie die Oxydation der Hydrate bis zum Ende gebracht wird, d. h. bis zur Bildung von CO_2 , indem bei denjenigen Kulturen, in denen Zn fehlt, wo der Atmungskoeffizient niedriger ist, ein Teil des Zuckers, außer demjenigen, der zur Bildung von CO_2 und von dem Pilze selbst verbraucht worden ist, als Produkt nicht vollkommener Oxydation der Hydrate zurückbleibt.

Eins von diesen Produkten, die Oxalsäure, wurde einerseits qualitativen Proben, andererseits einer eingehenden Bestimmung unterworfen. Beides wurde nach der Wehnerschen Methode gemacht¹⁾. Die Oxalsäure CO wurde als CaO durch Wiegen nach Durchglühen bestimmt. Gewöhnlich zeigte die qualitative Reaktion Oxalsäure, wenn auch nicht immer, in den Filtraten ohne Zn, es zeigten sich aber nur Spuren davon oder sie fehlte vollkommen bei Filtraten mit Zn. Die quantitative Bestimmung der Oxalsäure ergab 1,692 und 1,540, 0,6655 und 0,7585 g Säure in einem Substrat ohne Zn. Es ist unmöglich, diesen Daten eine Bedeutung beizumessen, da die früheren Untersuchungen bewiesen, daß die Wehnersche Methode zu diesem Zwecke vollkommen untauglich ist. Abgesehen davon, daß sie zu langwierig ist (das Oxydieren von $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ als Calciumsalz bis zum freien CO_2 geht recht langsam vor sich), die Hauptsache besteht darin, daß man nach Einwirkung von Essigsäure im Niederschlage nicht nur $\text{C}_2\text{O}_4\text{Ca}$ erhält, sondern ein Gemisch von zwei bis drei Salzen. In einer alkalischen Ammoniaklösung fehlen die Phosphorsäuren Salze von Ca, Mg und auch CaSO_4 , welche sich in Essigsäure nicht vollkommen auflösen lassen. Daher mußte zur oxydrometrischen Methode gegriffen werden. Die Oxalsäure wurde durch Oxydation von K_2MnO_4 aus dem Niederschlage der Wehnerschen Oxalsäure bestimmt, aus welchem einerseits durch Auswaschen die saure Reaktion von organischer Essigsäure ganz entfernt wurde. Um die Quantität des K_2MnO_4 nicht zu erhöhen, wird in einem Überfluß von SO_4H_2 aufgelöst. Bei den Kulturen ohne Zn wurde im Nährsubstrat 0,0073, 0,0007, 0,1784 g Säure erhalten. In den Kulturen mit Zn war gewöhnlich keine Oxalsäure vorhanden.

Versuche mit NO_3NH_4 .

In derselben Art, wie die Versuche mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, wurden auch die Versuche mit NO_3NH_4 angestellt. Die Proportion von ZnSO_4 war dieselbe: 0,001 Proz. bis 0,1 Proz. Die Sporen keimten nach 24 Stunden, die Konidien entwickelten sich im Normalsubstrat ohne Zn, sowie auch mit Zusatz von $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ am 4. Tage. Zn zeigte auf dem neuen Substrate einen viel größeren Einfluß als auf dem früher gebrauchten. Die Sporen entwickelten sich nur bei schwacher Konzentration von ZnSO_4 , und auch nur in geringer Anzahl; bei 0,1 Proz. war die Kultur steril. Bei Zusatz von Zn erhielt das Substrat auch eine bernsteingelbe Färbung, nur war diese schwächer als bei Zusatz von $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Die Wellenförmigkeit und Sprödigkeit der Pilzdecke nahm zu bei Verstärkung des Proz. von ZnSO_4 , und zwar in größerem Maße als bei $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

¹⁾ Botan. Zeitung. 1891. p. 273—280.

Versuch II.

Die Zn-Salze zeigten gleiche Wirkung bei verschiedenen Konzentrationen — 0,001 Proz. — 0,1 Proz. ZnSO_4 und übten keinen Einfluß auf die Zunahme der Trockenmasse des Pilzes aus

		t° 30° C in 7 Tagen		
— Zn $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	— Zn NO_3NH_4	+ 0,05% ZnSO_4 NO_3NH_4	+ 0,1% ZnSO_4 NO_3NH_4	
2,7731	2,4378	2,9135	2,9184	Trocken- Gewicht
2,0482	2,0687	2,9974	2,8786	
2,4106 g	2,2532 g	2,9554 g	2,8985 g	Mittleres Trocken-Gewicht

Aus dem Versuche II ersieht man, daß Zn, wenn es auch das Gewicht im Vergleich mit der Kultur ohne Zn erhöht, bei 0,05 Proz. und 0,1 Proz. denselben quantitativen Einfluß ausübt: 2,9554 und 2,8985 g; das macht nur 0,057 g. Dieser Versuch beweist, daß $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ seiner Nahrhaftigkeit nach dem NO_3NH_4 nicht nachsteht, wenn man nur die Trockenmasse des Pilzes in Betracht zieht, welche sich unter gleichen Verhältnissen gebildet hat.

Es wurden auch Versuche angestellt, um die Atmungs- und die ökonomischen Koeffizienten zu bestimmen. Zu diesem Zwecke wurde dieselbe Methode in allen Details angewandt.

Nehmen wir also die Atmungskoeffizienten und die ökonomischen Koeffizienten, und ziehen wir das Mittel für beide einzeln

Atmungskoeff. = $\frac{\text{CO}_2}{\text{die Ernte}}$		Ökonomiekoeff. = $\frac{\text{Zucker}}{\text{die Ernte}}$		
t° 30° C in 7 Tagen				
— Zn + 0,1% ZnSO ₄		— Zn + 0,1% ZnSO ₄		
2,7	2,5	3,3	3,2	
3,1	2,2	3,9	3,0	
1,8	1,8	2,9	2,9	
Aus Versuchen mit K (ferner)	2,4	—	3,1	—
Aus Versuchen mit Mg (ferner)	3,2	—	3,6	—
Mittlerer	2,6	2,1	3,4	3,0
Koeffizient	1,8	2,4	3,6	2,9
		Mit NO ₃ NH ₄ →		
		Mit SO ₄ (NH ₄) ₂ →		
				Aus ferneren Versuchen mit K Aus Versuchen mit Mg Mittlerer Koeffizient.

Aus den Tabellen für die Atmungskoeffizienten ist ersichtlich, daß mit ZnSO_4 die Atmungsenergie schwächer ist, als ohne Zn. Das ist um so merkwürdiger, da wir gewöhnt sind Zn für einen Reizstoff zu halten, der die Atmungsenergie und das Ausscheiden von CO_2 erhöht, worauf Kossinsky¹⁾ hinweist, und worauf auch meine eigenen Versuche mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ hinausführen.

Im Normalsubstrat (ohne Zn) mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ist der Atmungskoeffizient = 1,8, aber mit NO_3NH_4 = 2,6. Daraus kann man schließen, daß NO_3NH_4 ebenso ein Reizstoff ist, wie Zn.

Die Bestätigung, daß Zn günstig auf die Lebensfunktionen des Pilzes in einer Lösung mit NO_2NH_4 , und auf seinem Stoffwechsel einwirkt, finden wir nicht nur im Atmungs- sondern auch im ökonomischen Koeffizienten. Bei Zn wird er im Mittel von 3,4 bis auf 3,0 herabgesetzt. Der ökonomische

¹⁾ Jahrb. f. wiss. Botan. 37. 1902.

Koeffizient bei NO_3NH_4 entspricht weniger demjenigen mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ohne Zusatz von Zn. Die Verkleinerung des ökonomischen Koeffizienten weist wiederum auf die Wirkung von NO_3H hin, als auf einen Reizstoff, der den patentierten Reizstoffen, wie z. B. den Zn-Salzen, verwandt ist.

Für diesen Schluß spricht die Tatsache, daß unter gleichen Bedingungen die Fruchtbarkeit bei Zn in Lösungen mit NO_3NH_4 bedeutend mehr geschwächt wird, als auf Substraten mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. NO_3NH_4 ist an und für sich schon ein Reizstoff und wenn man dann noch einen neuen Reizstoff hinzufügt, wie ZnSO_4 , so muß das auf die Fruchtbarkeit und überhaupt auf die Entwicklung des Pilzes einen größeren Einfluß haben, als beim indifferentener schwefelsaurem Ammonium.

Außer CO_2 und Zucker wurde auch die Oxalsäure bestimmt, aber nur nach der Wehmer'schen Methode durch Ausglühen, so daß diese Daten eigentlich nichts zu bedeuten haben. Man könnte nur auf die Daten über den Oxalsäuregehalt in den vorliegenden Versuchen mit Mg und K hinweisen, denn in diesem Falle wurde die Oxalsäure auf oxymetrische Weise bestimmt.

Die erhaltenen Zahlen waren: 0,0034, 0,0036, 0,0427 g Oxalsäure. Bei Zn fehlte die Oxalsäure entweder vollständig oder hatte nur geringe Spuren hinterlassen. Das weist darauf hin, daß mit Zn der Zucker völlig zu CO_2 oxydiert, ohne die sogen. unvollkommenen Oxydationsprodukte zu bilden und derart den Pilz vor einem unnützen Hydratverbrauch zu hüten.

Auf Grund dieser Beobachtungen kann man folgenden Schluß ziehen:

1. Zn gehört nicht zu den unumgänglich notwendigen Elementen, ohne die sich der Pilz nicht entwickeln kann.

2. Zn gehört zu denjenigen Reizstoffen, welcher schon bei geringerer Konzentration, wie 0,001 Proz. ZnSO_4 , die Entwicklung des Pilzes beeinflussen.

3. Bei Verstärkung des Prozentsatzes von ZnSO_4 zeigt Zn in der Lösung fast gar keinen Einfluß auf die Steigerung des Wachstums im Vergleich mit 0,001 Proz. ZnSO_4 .

4. Zn verzögert die Fruchtbildung.

5. Zn verzögert die Fruchtbildung mehr noch bei NO_3NH_4 , als bei $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Bei $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ bildeten sich Sporen auch bei 0,1 Proz., aber nur schwach. Bei NO_3NH_4 waren schon sehr wenig Sporen, bei 0,008 Proz., bei 0,05 Proz. und 0,1 Proz. ZnSO_4 waren die Kulturen steril.

6. Der Atmungskoeffizient bei $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ mit Zn wird von 1,8 bis auf 2,4 erhöht. Der bei NO_3NH_4 mit Zn fällt von 2,6 bis auf 2,1.

7. Der ökonomische Koeffizient bei $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ und NO_3NH_4 mit Zn fällt von 3,6 und 3,4 auf 2,9 und 3,0. Zn verhilft dem Pilze dazu, seine Nährstoffe ökonomisch zu verwerten.

Versuche mit Mg und K.

Nachdem wir die Wirkungen von Zn, diesem typischen Repräsentanten der Reizstoffe aus der Gruppe der schweren Metalle, erforscht haben, wollen wir zur Frage von dem Einflusse der Metalle Mg und K auf den Pilz übergehen, welche von diesem Gesichtspunkte aus noch gar nicht untersucht worden sind. Vor allem Dingen mußte man in Erfahrung bringen, ob sich die Atmungs- oder ökonomischen Koeffizienten durch Zusatz von K und Mg im Vergleiche mit Kulturen auf Substraten ohne K oder Mg ändern. Da wir Daten besitzen und die physiologischen Eigenschaften von Zn kennen, können wir vergleichen, ob eine Analogie zwischen ihnen besteht, d. h. ob man K und

Mg zur Gruppe der Reizstoffe rechnen kann; wenn das möglich ist, auf Grund wessen und mit welchen Korrektiven.

R a u l i n¹⁾ wies auf Mg und K als auf notwendige und unersetzbare Bestandteile des Nährsubstrates für Pilze hin.

C. N ä g e l i²⁾ und Winogradsky³⁾ bestritten diese These, ersterer betreffs Mg und K, letzterer K. Nur M o l i s c h⁴⁾ und B e n e c k e⁵⁾ stellten endgültig die Notwendigkeit und Unersetzbarkeit von Mg und K für die normale Entwicklung der Pilze fest.

Obschon M o l i s c h behauptet, daß Ca Mg nicht ersetzen kann, deutet doch manches darauf hin, daß z. B. Hefe⁶⁾ bei Zusatz von Ca im Gewicht zunimmt und stärker gärt.

L o e w⁷⁾ hält Mg für giftig für Pflanzenorganismen, weil es seine Salze leicht dissoziiert.

Die Versuche wurden genau angestellt, wie diejenigen mit Zn.

0,28 Proz. CaSO₄ Calcium zum Substrat hinzugefügt, löste sich anfänglich nicht ganz und blieb als Niederschlag auf dem Boden des Gefäßes liegen, über ihm blieb die Flüssigkeit vollkommen klar. Zu Ende des Versuches löste sich aber CaSO₄ fast ganz; wenn ein trüber Niederschlag hinterblieb, so löste er sich vollkommen in 10 Proz. HCl. Um die Oxalsäure zu extrahieren, bearbeitet W e h m e r⁸⁾ das Pilzmycelium erst kalt mit HCl, sodann bringt er es ungefähr sechsmal bis zum Kochen in destilliertem Wasser, welches mit Salzsäure angesäuert ist. Ich riskiere es nicht, die Pilzdecke so auszulaugen, denn das könnte einen zu großen Einfluß auf das Gewicht des Pilzes ausüben. Außer der Oxalsäure würden sich auch noch viele andere Stoffe in dem durch Salzsäure und Kochen getöteten Pilzkörper lösen. Ich goß daher einfach die klare Flüssigkeit durch einen Filter ab, den im Gefäß zurückgebliebenen Pilz übergoß ich mit 10 Proz. HCl, nach einer Weile, jedenfalls bald darauf, wurde die Salzsäure abfiltriert und mit destilliertem Wasser abgewaschen. Im Filtrat wurde die Oxalsäure in Form von BaCl₂ niedergeschlagen und, wie schon gesagt, auf oxydimetrischem Wege bestimmt.

Das Filtrat ohne Mg mit Ca war farblos, mit Mg gelb.

In den Fällen, wo Mg fehlte, keimten zwar die Sporen, aber die fernere Entwicklung war sehr schwach. Die einzelnen Kolonien, die nicht zu einer Pilzdecke verschmolzen waren, waren buschig, die Fäden verliefen im Substrat in allen Richtungen, als ob sie nach dem fehlenden Elemente suchten. Auf einem normalen Substrat verzweigen sich die Hyphen des Pilzes nie ins Innere, sondern wachsen nur an der Oberfläche.

Im Substrate mit Mg keimen die Sporen schon am 2. Tage, auf solchen ohne Mg und Ca oder nur mit CaSO₄ etwas langsamer (am 3. Tage). Auf Substraten nur mit Ca bildet *Aspergillus niger* niemals Sporen. Die Kulturen mit Mg und die mit Mg und Ca zusammen unterschieden sich dem Äußeren nach gar nicht voneinander, weder bezüglich des Keimens der

¹⁾ Annal. sc. natur. Sér. 5. T. 9. 1889. p. 230—237.

²⁾ Sitz.-Ber. München. Akadem. 1879. p. 458.

³⁾ Arbeit d. St. Petersburg. Naturf. Ges. Bd. 14. 1884.

⁴⁾ Sitz.-Ber. d. Wien. Akadem. Bd. 103. I. 1894.

⁵⁾ Jahrb. f. wiss. Botan. Bd. 28. 1895.

⁶⁾ L a f a r, Handb. d. techn. Mykol. Bd. 4. 1905. p. 85; A. K o s s o w i c z, Zeitschr. d. landw. Versuchswes. Österr. Bd. 6. 1903. p. 731.

⁷⁾ Flora. Bd. 50. p. 368.

⁸⁾ Botan. Zeitung. Bd. 49. 1891. p. 276.

Sporen und ihres Erscheinens, noch in der Bildung der Pilzdecke. Die Konzentration von MgSO_4 war: 0,125 Proz.; 0,25 Proz.; 0,5 Proz.

Bei allen Konzentrationen entwickelte sich der Pilz vollkommen gleich.

Auf Kulturen mit 0,5 Proz. MgSO_4 waren weniger Sporen als beim normalen Gehalt von 0,25 Proz. MgSO_4 . Die Schwächung der Fruchtbarkeit verdient eine besondere Berücksichtigung. Die Bestandteile des Substrates waren dieselben, wie in den früheren Versuchen mit Zn. In den meisten Fällen enthielt es $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ und nur bei den zwei letzten Versuchen $\text{NO}_3(\text{NH}_4)$.

Um es recht anschaulich zu machen, wollen wir alle Wiegunen in eine Tabelle zusammenfassen, ungeachtet der Konzentration von MgSO_4 und CaSO_4 und gleichgiltig, ob die Kulturen mit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ und NO_3NH_4 ange stellt waren, da zwischen diesen beiden ein verhältnismäßig kleiner Unterschied vorhanden ist, und sodann das Mittel aus dem Gewicht des Pilzes ziehen.

Tabelle der Gewichte

— Mg — Ca	+ CaSO_4 0,25%	t° 30° C, siebentägige Kultur	
		+ MgSO_4 0,25%	+ MgSO_4 0,25% + CaSO_4 0,25%
0,3394 g	0,2057 g	2,6660 g	3,0418 g
0,0731 g	0,0820 g	2,6638 g	3,3954 g
0,0774 g	0,0746 g	1,9896 g	1,7168 g
0,0790 g	0,0878 g	2,6142 g ¹⁾	1,5632 g ¹⁾
0,2858 g	0,0544 g	0,7988 g	1,5404 g
0,2018 g	0,0372 g	1,1922 g	0,9524 g
0,1746 g	0,1604 g	2,3794 g	3,0358 g
0,2102 g	0,0928 g	2,5552 g	2,6962 g
0,3190 g	0,5216 g ²⁾	2,6730 g	2,8728 g
0,196 g	0,099 g	2,114 g	2,40 g
im Mittel	im Mittel	im Mittel	im Mittel

Aus diesen Tabellen ersehen wir, daß Ca an und für sich gar keine Bedeutung als Nährstoff besitzt. Es beeinflußt nicht im mindesten die Entwicklung des Pilzes; er wächst nicht rascher; im Gegenteil wird die Masse sogar verringert im Vergleiche mit den Kulturen, wo Mg und Ca fehlen. Ganz anders verhält es sich in dem Falle, wo Ca zu einem Substrat mit Mg hinzugefügt wird. Hier bemerkt man gleich eine Vergrößerung der Trockenmasse, welche durch intensives Wachstum hervorgerufen ist, wie wir das schon früher bei den Kulturen mit Zn bemerkt haben. Um einen tieferen Einblick in die Bedeutung von CaSO_4 und seine Gesamtwirkung mit MgSO_4 zu erhalten, muß man den Stoffwechsel und dessen Produkte erforschen. Die Atmungskoeffiziente waren folgende

+ MgSO_4	1,1	1,2	1,6	1,5	1,35	{ Mittlerer Atmungs- koeffizient
+ MgSO_4 + CaSO_4	1,3	0,8	1,5	1,5	1,27	

So erhalten wir den mittleren Atmungskoeffizienten für $\text{MgSO}_4 = 1,4$ und für $\text{Mg} + \text{Ca} = 1,3$. Aus diesen Zahlen den Schluß zu ziehen, daß durch

¹⁾ Diese Zahlen wurden bei der Berechnung des Mittels nicht in Betracht gezogen, da der Unterschied in den Gewichtsschwankungen aus irgendwelchen Gründen größer war, als es zulässig ist.

²⁾ Wurde bei Berechnung des Mittels nicht in Betracht gezogen, weil der Pilz nicht mit HCl bearbeitet war, weshalb das Mycelium kleine Teile von CaSO_4 zurückgehalten und darum an Gewicht zugenommen hatte.

Ca der Atmungskoeffizient herabgesetzt wird, ist noch erfrüht, da wir noch keinen genügenden Grund dazu haben. Der Mg + Ca ermöglicht dem Pilze einen geringeren Zuckerverbrauch zum Atmen, hilft die Oxydation der Hydrate bis zu ihrem Endstadium CO_2 zu führen und nicht auf halbem Wege stehen zu bleiben, was durch die Versuche bestätigt wird. Die Kulturen mit Mg + Ca enthielten immer weniger Oxalsäure im Vergleiche mit denen, die nur Mg enthielten. Daß Mg + Ca einen sparsameren Verbrauch der Nährsalze bedingt, ersehen wir nur aus der Größe der ökonomischen Koeffizienten.

Für Kulturen mit MgSO_4 ist der Koeffizient = 3,2, für die mit Mg + Ca = 2,6.

Tabelle des ökonomischen Koeffizienten.

+ MgSO_4	3,6	3,6	3,5	3,5	2,8	2,6	2,8	2,7	3,6	3,2	} Mittlerer Ökonomie- Koeffizient
+ MgSO_4 + CaSO_4	3,2	2,9	2,7	3,0	2,7	1,9	3,1	1,0	—	2,6	

Eine gute Illustration zu dem Einflusse der Quantität CaSO_4 auf den ökonomischen Koeffizienten bietet einer der Versuche. Bei der halben Quantität von CaSO_4 blieb der ökonomische Koeffizient gerade zwischen den Koeffizienten der zwei nächstliegenden Kulturen ohne Ca und mit der vollen Quantität CaSO_4 stehen. Die erhaltenen Koeffizienten sind 3,5 ohne Ca; 3,2 bei der Hälfte von Ca und 3,0 bei der vollen Quantität Ca.

Wir sehen also, daß CaSO_4 das Wachstum befördert, eine Vergrößerung der Pilzmasse hervorruft, die Bildung von Oxalsäure beschränkt und zur Verminderung des ökonomischen Koeffizienten beiträgt.

Jetzt wollen wir den Einfluß von Mg auf *Aspergillus niger* untersuchen. Das Gewicht wird durch Erhöhung des Prozentgehaltes von MgSO_4 vergrößert. Die Atmungskoeffizienten zeigen eine Herabminderung, besonders deutlich ist das im Versuche mit NO_3NH_4 , wo der Atmungskoeffizient von 3,2 auf 2,5 fällt. Also befördert die Erhöhung des Prozentgehaltes von Mg die Zuckerökonomie. Daß Mg günstig auf die Lebenstätigkeit und den Stoffwechsel einwirkt, wird durch die ökonomischen Koeffizienten bestätigt.

Tabelle der ökonomischen Koeffizienten.

+ MgSO_4 0,25%	3,6	3,6	3,5	3,5	2,8	2,8	3,6	3,35	} Mittlerer Ökonomie- Koeffizient
+ MgSO_4 0,5%					2,6	2,7	3,2	2,8	

Daraus schließen wir, daß Mg durch Erhöhung seines Prozentgehaltes im Substrate das Wachstum des Pilzes beschleunigt, seine Masse vermehrt und die Atmungs- und ökonomischen Koeffizienten herabsetzt.

Jetzt bleibt nur noch übrig, das Trockengewicht und die Atmungs- und ökonomischen Koeffizienten der Pilzkulturen mit und ohne Mg zu vergleichen:

— Mg } — Ca }	Atmungs-Koeffizient	5,7	7,1					6,4	} Mittlerer Atmungs- Koeffizient
— Mg } — Ca }	Ökonomie-Koeffizient	14,0	7,7	12,5	12,0	6,5	8,6	10,0	

Aus der allgemeinen Gewichtstabelle ist ersichtlich, daß der Zusatz von MgSO_4 zum Substrat die Pilzmasse von 0,19 g bis auf 2,114 g vergrößert, d. h. um mehr als das Zehnfache. Was den ökonomischen Koeffizienten anbetrifft, so fällt er in den Kulturen ohne Mg von 10,0 bis auf 3,35 in den Kulturen mit MgSO_4 . D. h. die Wirkung von Mg ist der Wirkung von Zn gleich. Mg ist nicht nur notwendig als Nährelement, sondern dient auch noch dazu,

den Zuckerverbrauch zu verringern und den Prozentgehalt von $MgSO_4$ im Substrate zu vergrößern.

Vergleichen wir die Wirkung der Mg-Salze allein auf die Lebensfunktion von *Aspergillus niger* mit der Wirkung von Mg und Ca zusammen, so finden wir eine ungemeine Übereinstimmung. Das Gewicht vergrößert sich um ein und dasselbe Quantum, die Atmung wird geschwächt und die ökonomischen Koeffizienten bleiben fast dieselben, ja die der Kulturen mit Ca waren sogar vergrößert als diejenigen, wo Ca sowie Mg fehlten. Eine solche Übereinstimmung der Resultate läßt uns schließen, daß alles, was mit dem Organismus vor sich geht, bei Zusatz von Ca von der Verstärkung des Mg-Gehalts abhängt, und daß die Ca-Wirkung ausschließlich dem Mg zuzuschreiben ist. Ca als Metall betrachtet, ist doppelwertig, und dem Mg verwandt, und ersetzt Mg als Base; in Verbindungen ist Ca an und für sich als Nährmittel untauglich.

Ein Freiwerden des Mg ist um so wahrscheinlicher, als die Mg-Salze viel leichter dissoziieren, als die Ca-Salze. Wenn Mg frei geworden ist und auch von den Nebenfunktionen, dem Neutralisieren von Säuren u. a. befreit ist, so wird dadurch die Quantität des Mg vergrößert und die Verstärkung der Mg-Konzentration ruft die uns schon bekannten Wirkungen hervor. Auf diese Weise kann man die Wirkung des Komplexes $Mg + Ca$ auf Grund der erwähnten Versuche erklären. Das widerspricht der *Loew*schen Theorie über die Giftigkeit der Mg-Salze.

Streng genommen sind die Salze sämtlicher Elemente giftig, wenn sie eine gewisse Konzentration erreicht haben, die aber verschieden für die verschiedenen Elemente sind. Die stärkste Konzentration für Zn-Salze, die noch günstig auf den Pilz einwirkt, ist 0,1 Proz.; die Konzentration der Mg-Salze scheint bis auf 0,5 Proz. verstärkt werden zu können. Bei einem Prozentsatz von $MgSO_4$ von 0,5 Proz. macht sich schon eine Schwächung der Sporenbildung bemerkbar, und dieser Umstand weist darauf hin, daß dies die höchste Konzentration ist, die eine normale Wirkung auf den Organismus ausübt.

Versuche mit K.

Das letzte Metall, welches das Nährsubstrat enthält, ist K. In den wenigen Versuchen, die ich aufgestellt habe, beabsichtigte ich, seine Wirkung auf *Aspergillus niger* und seine Rolle im Stoffwechsel aufzuklären. Gleichzeitig mit K stellte ich zum Vergleiche auch noch Kulturen mit Na auf, seinem nächsten Nachbar unter den Alkalien. Wie bei den früheren Versuchen wurde auch hier immer ein allgemeines Substrat für alle Gefäße bereitet, und dann nur in die einzelnen Gefäße entweder K oder Na hinzugefügt.

Die Kulturen mit Na entwickelten sich ebenso schwach, wie die Kulturen ohne K und ohne Na.

Sporen bildeten sich nicht, nur zuweilen vereinzelte Konidienträger. Na, dieses unumgängliche Element in der Tierwelt ist hier vollkommen untauglich und hat gar keine Bedeutung als Nährstoff. Die Atmungskoeffizienten derjenigen Kulturen, die nur Na und kein K enthielten, waren immer niedriger als der Koeffizient derjenigen Pilze, deren Substrate weder Na noch K enthielten. Kulturen mit verdoppelter K-Konzentration zeigten immer eine Vergrößerung des Trockengewichtes im Vergleiche mit den Normalkulturen. Die Pilzdecke sah ganz gesund aus und unterschied sich gar nicht von den Kulturen mit dem gewöhnlichen K-Gehalt. Die Fruchtbarkeit war

nicht geschwächt. Überhaupt waren bei 0,624 Proz. K_2SO_4 gar keine Anomalitäten zu beobachten.

Das übliche Pilzsubstrat enthält 0,14 Proz. K (bei 0,5 Proz. KH_2PO_4), was 0,3123 Proz. K_2SO_4 macht; in dieser Quantität wurde K auch dem Normalsubstrate hinzugefügt.

Aus den Versuchen kann man annehmen, daß die Verstärkung der Kaliumkonzentration das Atmen etwas erhöht, der ökonomische Koeffizient aber herabgesetzt wird; K ermöglicht es also dem Organismus, die Nährstoffe, zu denen auch die Hydrate zählen, sparsamer auszunutzen. Hier finden wir eine vollkommene Analogie mit Zn.

Schon B e n e c k e¹⁾ bemerkte eine ungemeine Empfindlichkeit der Pilze sogar gegen minimale Dosen von K und Mg, denjenigen Elementen also, ohne die sich der Organismus nicht normal entwickeln kann. B e n e c k e wies auch, als auf eine merkbare Tatsache hin, daß das Gewicht des Pilzes nicht proportional der Verringerung des Prozentgehalts von Mg und K abnimmt, sondern bedeutend langsamer. Die Stoffe, die schon in minimalen Quantitäten auf den Organismus einwirken, nennt man Reizstoffe, und unter denselben nimmt Zn eine hervorragende Stellung ein.

Eine solche Gleichheit des Einflusses der Mg und K-Salze einerseits und der Zn-Salze andererseits macht sich nicht nur in der Zunahme der Pilzmasse bemerkbar, sondern auch in der Atmungsenergie und im Verbräuche des Zuckers und anderer Nährstoffe. Bei Zusatz von K und Mg zum Substrat, in dem sie nicht enthalten waren, fällt der ökonomische Koeffizient, und wird bei Verstärkung des Prozentgehaltes noch mehr herabgesetzt. Dasselbe läßt sich auch bei Zn beobachten; dies ruft eine konsequente Erniedrigung des ökonomischen Koeffizienten hervor.

Die Mg und K-Salze sind also nicht nur unstreitig notwendige und unersetzbare Elemente des Pilzsubstrates, sondern dienen auch noch als Reizstoffe, die den Organismus anregen und seine Lebensfunktionen erhöhen. Sie unterscheiden sich von den übrigen Reizstoffen dadurch, daß sie zur direkten Ernährung dienen und als Bestandteile dem Pilzkörper angehören; die übrigen sind dazu absolut untauglich.

Die Energie und die Giftigkeit der verschiedenen Reizstoffe ist ja auch nicht gleich. Nach O. O n o grenzt die stimulierende Wirkung für $HgCl_2$ an 0,0027 Proz., für $CaSO_4$ steigt sie bis auf 0,0012 Proz.; unseren Versuchen nach beträgt sie für $Zn SO_4 = 0,1$ Proz., nach R i c h a r d für Ni und Co gegen 0,13 Proz., aber für $FeSO_4$ ist 0,2 Proz. zu wenig; für $MgSO_4$ kann man, wie wir gesehen haben, auch 0,5 Proz. brauchen, für K sogar bis zu 0,62 Proz. K_2SO_4 .

¹⁾ Jahrb. f. wiss. Botan. Bd. 28. 1895.

Nachdruck verboten.

Zur Biologie der Schwarzfleckenkrankheit der Ahornbäume, hervorgerufen durch den Pilz *Rhytisma acerinum*.¹⁾

Von Dr. Karl Müller.

Wissenschaftlicher Hilfsarbeiter (II. Beamter) an der Großherzogl. landwirtschaftlichen
Versuchsanstalt Augustenberg i. Baden.

Mit 4 Tafeln und 4 Textfiguren.

Inhaltsübersicht.

I. Einleitung	67
II. Literatur	68
III. Biologie des Pilzes	
a) Beobachtungen im Freien	69
b) Impfversuche im Freien	72
c) Ergebnis der Infektionsversuche im Freien	78
d) Impfversuche im Gewächshaus	79
IV. Bemerkungen über das biologische Verhalten anderer Rhytisma-pilze	84
V. Abhängigkeit der Rhytisma-erkrankung von der Witterung	87
VI. Morphologie des Pilzes und biologische Einzelheiten	
a) Sklerotien	89
b) Askosporen	93
c) Spermatien	94
VII. Schädlichkeit der Pilze	95
VIII. Wichtigste Ergebnisse	96

I. Einleitung.

Die parasitischen Pilze unserer Kulturpflanzen zeichnen sich durch ganz auffallend starke Abhängigkeit von der Wirtspflanze aus. Früher glaubte man, diese Pilze kämen auf den verschiedensten höheren Pflanzen vor, eine Ansicht, die auch heutigentags in Laienkreisen noch weit verbreitet ist. Die Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben immer deutlicher bewiesen, wie sehr die meisten parasitischen Pilze nur an eine oder doch sehr wenige Wirtspflanzen-Arten angepaßt sind, daß also die Keime eines Pilzes nur auf einer bestimmten Pflanzenart wachsen können, auf andern dagegen gar nicht oder doch bald absterben. Wenn wir darum auf nahestehenden Pflanzenarten ähnliche Pilze vorfinden, dann handelt es sich fast immer nicht um den gleichen Pilz, sondern um einen speziell für die nahestehende Pflanzenart angepaßten, um eine sogenannte biologische Art, oder spezialisierte Form, wie man sie auch genannt hat.

Es ist nicht meine Absicht, die Ursache dieser Spezialisierung der parasitären Pilze zu erörtern; es sei nur noch darauf hingewiesen, daß wir derartige Zersplitterungen der Arten, in biologische, aber nicht, oder wenigstens nur selten, morphologisch unterscheidbare Formen, bei allen parasitär auftretenden Organismen kennen, weniger allerdings im Tierreich, als im Pflanzenreich. Sie kommen z. B. häufig bei Bakterien vor und auch bei den Knöllchenbakterien der Leguminosen ist neuerdings ein genau gleiches Verhalten festgestellt worden²⁾.

¹⁾ Eine vorläufige Mitteilung über einen Teil der nachstehenden Untersuchungen erschien in den Ber. d. Deutsch. Botan. Gesellsch. Vol. 30. 1912. p. 385 unter dem Titel: Über das biologische Verhalten von *Rhytisma acerinum* auf verschiedenen Ahornarten.

²⁾ Maassen u. Behn, Über die Bakterien in den Knöllchen der verschiedenen Leguminosenarten. (Mitteil. d. Biol. Anst. f. Land- u. Forstwirtsch. Bd. 4. 1907. p. 42.)

Der erste, der an die Existenz biologischer Arten bei parasitären Pilzen dachte, und uns durch zielbewußte Versuche eine große Zahl kennen lehrte, war anscheinend P l o w r i g h t¹⁾. Er kam zu dieser Annahme bei seinen Infektionsversuchen mit Rostpilzen. Äußerlich nicht unterscheidbare Rostpilz-Sporen einer und derselben „Art“ verhielten sich bei den Infektionen ganz verschieden. Die P l o w r i g h t'sche Vermutung, daß hier spezialisierte Formen vorliegen könnten, hat sich dann hundertfach bestätigt und E r i k s s o n²⁾, der ebenfalls zahlreiche Infektionen mit Rostpilzen ausführte, kam zu dem Schluss, „daß die Spezialisierung des Parasitismus wahrscheinlich in der ganzen Parasitenlehre mehr oder weniger scharf durchgeführt werden könne“.

Ähnlich äußert sich R o s t r u p³⁾. Er gibt auch zahlreiche Pilze an, bei denen er eine Gliederung in biologische Arten für wahrscheinlich hält, unter anderen auch *Rhytisma acerinum*. Leider fehlen aber für die meisten der Angaben irgendwelche Beweise. Nur die wichtigsten Familien der parasitären Pilze, die Erysipheen, Uredineen, Ustilagineen, dann das Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) und wenige andere wurden bis jetzt eingehender untersucht. Bei allen diesen Pilzen konnten zahlreiche biologische Arten festgestellt werden.

Durch Beobachtungen in der Natur drängte sich mir die Frage auf: Kommen auch bei dem häufigen *Rhytisma acerinum* biologische Arten vor?

Auf Grund der eben besprochenen Untersuchungen über andere parasitische Pilze wissen wir, wie sehr der Parasit sich an seine Wirtspflanze anpassen kann und daß in dieser Anpassungsmöglichkeit kleine Unterschiede vorhanden sind, die offenbar durch die verschiedenartige Beschaffenheit des Protoplasmas der Wirtspflanze, weniger durch morphologische Eigentümlichkeiten zu erklären sein werden.

Diese Erwägungen und meine Beobachtungen über das Verhalten der *Rhytisma*-Pilze in der Natur machten die oben aufgeworfene Frage wahrscheinlich.

Das Studium der Literatur ergab nun aber, daß dieser Gedanke schon anderen aufgetaucht und bereits experimentell geprüft war. Ich möchte darum zunächst die über die Biologie von *Rhytisma acerinum* vorhandene Literatur einer kritischen Besprechung unterziehen.

II. Literatur.

F u c k e l schreibt in seinem *Symbolae mycologicae*⁴⁾ betitelten Werke von *R. h. acerinum*: „ändert sehr ab in Form und Größe, so daß eine genauere Untersuchung wohl mehrere Arten ergeben wird“.

J. M ü l l e r⁵⁾ untersuchte darauf den Runzelschorf von Ahornbäumen verschiedenster Herkunft, um die Ansicht F u c k e l's zu prüfen. Die Art und Weise, wie J. M ü l l e r seine Untersuchungen anstellte, ist rein morpho-

¹⁾ P l o w r i g h t, A Monographie of the British Uredineae and Ustilagineae etc. London 1889.

²⁾ E r i k s s o n, Über die Spezialisierung des Parasitismus bei den Getreiderostpilzen. (Ber. Deutsch. Botan. Gesellsch. Bd. 12. 1894.)

³⁾ R o s t r u p, Einfluß der Wirtspflanze auf die Entwicklung neuer Arten parasitischer Pilze. [Dänisch.] (Overs. K. Dansk. Vid. Selsk. Forh. 1896. p. 113—134.)

⁴⁾ Jahrb. Nassau. Ver. f. Naturk. Bd. 22 u. 23. Wiesbaden 1869—1870.

⁵⁾ M ü l l e r, J., Zur Kenntnis des Runzelschorfes und der ihm ähnlichen Pilze. (Jahrb. f. wissenschaft. Botan. Bd. 25. H. 4. 1893. Taf. 27—29.)

logisch. Er teilt die Sklerotien-Flecken der Größe nach in verschiedene Typen und fand, daß die größten Flecken die längsten Sporenschläuche und längsten Sporen, aber die geringste Dicke des Stromas besitzen. Da alle unterschiedenen Typen nach J. Müller durch Übergänge verknüpft sind, rechtfertigen seiner Ansicht nach alle aufgefundenen Unterschiede keine Absonderung. Er sagt selbst: „Jedenfalls haben die angestellten Beobachtungen als feststehend ergeben, daß wir innerhalb des *Rhytisma acerinum* soweit die Untersuchung reicht, es wohl mit stufenweisen Abänderungen, Varietäten, wenn man will, nicht aber, wie Fuckel und andere vermuteten, mit besonderen Arten zu tun haben, daß also nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung nur die schon vor langer Zeit aufgeführten beiden Spezies: 1. *Rhytisma acerinum* und 2. *Rh. punctatum* Geltung haben.“

Wie wir später sehen werden, hängt die Größe der Sklerotienflecke teilweise von äußeren Bedingungen ab, da bei späterer Infektion die Flecken kleiner bleiben, als bei frühzeitiger und da sie bei feucht-schwülem Wetter größer werden, als bei trockenem.

In allen pflanzenpathologischen oder systematischen Arbeiten, die ich einzusehen Gelegenheit hatte, wird *Rhytisma acerinum* wie bei J. Müller als einheitliche Art aufgefaßt, die *Acer platanoides*, *A. pseudoplatanus* und *A. campestre* infizieren soll.

Wenn ich nun trotzdem noch einmal mich mit diesem Pilz befasse, so hat das seinen Grund darin, daß meine Beobachtungen sich mit mehreren Angaben J. Müllers über das Vorkommen der Sklerotien nicht decken und daß ich auf ganz anderem Wege, nämlich auf biologischem, durch Infektionen, die Frage zu entscheiden suchte, ob mehrere biologische Arten unter *Rh. acerinum* zusammengefaßt werden.

Gleichzeitig konnten im Verlaufe dieser Untersuchungen manche morphologische und biologische Punkte, die bisher noch nicht untersucht waren oder über die bis jetzt Meinungsverschiedenheiten herrschten, geklärt werden.

Da alljährlich immer nur eine kurze Zeitspanne für die anzustellenden Versuche in Betracht kommt, da die Beschaffung günstigen Infektionsmaterials auf manche Schwierigkeiten stieß und der Erfolg der Impfung erst nach Wochen zu erkennen ist, bei negativem Ausfall, wegen zu geringer Keimfähigkeit der Sporen oder aus anderen Gründen, jedoch neue Versuche erst im folgenden Jahre wieder angesetzt werden konnten usw., hat sich die Fertigstellung dieser Arbeit über mehrere Jahre hingezogen.

III. Biologie des Pilzes.

a) Beobachtungen im Freien.

Nach J. Müller sollen die verschiedenen, durch die Größe der Flecken von ihm unterschiedenen Typen an den Stellen, wo sie vorkommen, ausschließlich anzutreffen sein, d. h. sie sollen stets an einen bestimmten Bezirk gebunden sein. Daß das zutrifft, aber ebensooft auch nicht, habe ich wiederholt beobachtet; es hängt das ganz von der Wirtspflanze ab.

Beispielsweise sollen an den Ahornen der Allee im Park von Schwetzingen stets die ganz großen Flecken anzutreffen sein, dagegen ein anderer Typus mit kleineren Flecken z. B. stets an den Ahornbäumen in Gräfenberg (Schlesisch-Österreichische Grenze).

Leider geht aus den Mitteilungen J. Müllers nie hervor, auf welcher Ahornart er einen bestimmten Typus der Sklerotien auffand¹⁾.

Meine Beobachtungen im Freien haben gezeigt, daß die Annahme J. Müllers, die Stärke der Infektion hänge von der Entfernung der Blätter vom Erdboden ab, nur mit Beschränkung richtig ist. J. Müller sagt nämlich, die Ahornsträucher, welche die Blätter nahe dem Boden ausbreiten, hätten stets viele kleine Pilzflecken, während weiter vom Erdboden entferntstehende Blätter stets nur vereinzelte, aber sehr große Flecken zeigten.

Es kann aber vorkommen, daß Spitzahorngebüsche nahe dem Boden sehr große Rhytisma-Flecken auf den Blättern haben und Bergahornbäume oben in der Krone nur kleine.

Zunächst seien einige eigene Beobachtungen über das Auftreten von Rhytisma an Spitz-, Berg- und Feldahorn mitgeteilt:

1. Bei Durlach waren im Sommer 1908 mehrere Bergahornbäume so stark von den kleinen Rhytisma-Flecken befallen, daß die Blätter im Juli welkten und abfielen (vgl. Taf. I, Fig. 1). Ein danebenstehender Spitzahornbaum war dagegen völlig frei von dem Pilze.

2. Zwischen Durlach und Ettlingen finden sich alljährlich überaus reich von Rhytisma heimgesuchte Bergahorne und daneben ausgedehnte Feldahorngebüsche, die aber stets frei von dem Pilze waren.

3. An einer andern Stelle, im Rittnertwalde bei Durlach, fand ich erstmals im Sommer 1909 viele Hundert, damals etwa 3—4-jährige Bergahornbäumchen und dazwischen gleichaltrige Spitzahorne. Die Blätter der Bergahorne waren im August stark von Rhytisma befallen — eine Ausnahme in dem sonst den Rhytisma-Pilzen wenig günstigen Jahre —, die der dazwischenstehenden Spitzahorne dagegen gar nicht. Selbst dann, wenn Spitz- und Bergahorne so dicht beisammenstanden, daß das Blattwerk beider Stöcke durcheinander wuchs und eine Krone bildete, war nur der Bergahorn befallen (vgl. Tafel I, Fig. 2). Erst nach langem Suchen gelang es, an einer beschränkten Stelle Spitzahorne zu finden, die auf manchen Blättern je 1 oder höchstens 2 Rhytisma-Flecken zeigten. Die Flecken sahen aber anders aus, als die auf den Bergahornblättern; sie waren in der Entwicklung noch zurück, verglichen mit den letztgenannten.

Nach dem spärlichen Befall der wenigen Spitzahornbäumchen und nach dem später geschilderten Infektionsversuchen zu schließen, ist offenbar ein Spitzahornblatt mit Rhytisma-Sklerotien an jene Stelle angeweht worden, an welcher die Spitzahorne Flecken zeigten.

Hierfür sprechen auch die Beobachtungen in den folgenden Jahren (1910—1912), in denen stets nur befallene Bergahorne zu finden waren, nachdem ich im Herbst 1909 die wenigen Spitzahornblätter, welche schwarze Flecken zeigten, entfernt hatte.

4. Auch an zahlreichen andern Gegenden Badens hatte ich Gelegenheit, festzustellen, daß bei gemeinsamem Vorkommen von Berg- und Spitzahorn dicht infizierte Bergahorne neben völlig gesunden Spitzahornen standen. Die Bergahornsklerotien waren in solchen

¹⁾ Herr Dr. J. Müller hatte jedoch auf eine briefliche Anfrage meinerseits die Güte, mir hierüber Auskunft zu geben: In Schwetzingen handelt es sich um Spitzahorne (*A. platanoides*), in Gräfenberg um Bergahorne (*A. pseudoplatanus*).

Fällen immer kleiner als die, welche auf den Spitzahornblättern aufzutreten pflegen.

Diese Beobachtungen hätten meine Vermutung, *Rh. acerinum* bestehe aus zwei Arten, zur Gewißheit erhoben, wenn mir nicht auch Beispiele bekannt geworden wären, die eine solche einfache Erklärung nicht für zulässig erscheinen ließen.

5. Neben der Waldseestraße bei Freiburg i. Br. stehen z. B. Spitzahornbäume und dazwischen ab und zu einzelne Bergahorne. Fast in jedem Herbst sind nun die Spitzahorne so stark von *Rhytisma* befallen, daß $\frac{1}{3}$ bis fast $\frac{1}{2}$ der Blattfläche der unteren Blätter von den bekannten 1,5—2 cm im Durchmesser messenden pechschwarzen Sklerotienflecken bedeckt ist. Die Bergahorne tragen dagegen alljährlich weniger Flecken von 0,5—1 cm Durchmesser. Dieser Befund, der Anlaß zu der vorliegenden Arbeit gab, konnte durch das gleichzeitige Vorkommen zweier verschiedener Arten erklärt werden, oder aber durch die Annahme, *Rh. acerinum* gehe auf Berg- und Spitzahorne über. Jedenfalls stand er aber im Gegensatz zu den Beobachtungen, die bei Durlach (Beispiel 1 und 3) gemacht wurden.

6. Ein ähnlicher Fall wurde von mir seit 1910 in der Ravennaschlucht im Höllental beobachtet. Dort stehen Berg- und Spitzahorne auf schattigem Boden zu einer Gruppe vereint. Beide sind alljährlich reich von *Rhytisma* befallen, die Flecken auf den Bergahornblättern sind aber nahezu ebenso groß wie beim Spitzahorn. Auch hierfür hätte die für das Auftreten der *Rhytisma*-Pilze an der Waldseestraße bei Freiburg gegebene Erklärung (Beispiel 5) zutreffen können. Wie die später zu schildernden Infektionsversuche zeigten, handelte es sich aber bei Beispiel 5 und 6 um zwei verschiedene biologische Arten, die ein ähnliches Krankheitsbild verursachten.

Das Bestreben, das biologische Verhalten von *Rh. acerinum* durch Beobachtungen in der Natur zu ergründen, wurde durch folgende Beobachtungen weiter erschwert:

7. Aus einem Bergahornbusch im Schloßgarten in Karlsruhe erhebt sich ein Spitzahorn. Dieser zeigte im Herbst 1907 stark befallene Blätter, während die des Bergahorns frei von Sklerotien waren. Im Herbst 1908 nach vorausgegangenem feuchtwarmem Frühjahr, war die Infektion noch stärker als im vorhergegangenen Jahr, nun zeigte aber auch der Bergahorn einige Flecken von gleicher Größe und gleichem Aussehen, wie die des Spitzahorns. Im Herbst 1909 war dagegen der Befund wieder dem von 1907 gleich.

Die gegebenen Beispiele, die nicht weiter vermehrt werden sollen, werden zur Genüge gezeigt haben, daß nur Infektionsversuche eine Entscheidung darüber zulassen, ob auf Spitz- und Bergahorn verschiedene biologische Arten vorkommen oder nicht, denn die morphologischen Merkmale genügten nicht zur Abtrennung einer Art; in dieser Hinsicht stimmen die hier angeführten Fälle mit den Wahrnehmungen J. Müllers überein. Die Beobachtungen in der Natur waren zu widersprechend, um eine einfache Deutung über das biologische Verhalten von *Rh. acerinum* auf Bergahorn und Spitzahorn zuzulassen.

Wie sich *Rh. acerinum* von *Feldahornblättern* in dieser Hinsicht verhält, ist schon deshalb durch Studien im Freien schwer festzustellen, weil dieser Ahorn nur selten in Gemeinschaft mit Spitzahorn und Bergahorn wächst und, wenn das einmal zutrifft, nicht gerade von *Rhytisma* befallen zu sein braucht.

In der Literatur findet sich eine Notiz hierüber.^{1) 2)}:

8. Am Hasliberg im Berner Oberland beobachtete E. d. Fischer reich von *Rhytisma* befallene Spitzahorne, während dabei stehende Feldahorne nicht unter der Krankheit litten. Fischer schreibt selbst: „Der Gegensatz zwischen letzteren und *Acer platanoides* war besonders frappant an einer Stelle, wo beide dicht nebeneinander standen. Es muß vorläufig dahingestellt bleiben, ob *Acer campestre* wirklich weniger empfänglich ist, oder ob sein schwaches Befallenwerden davon herrührt, daß seine Blätter zur Zeit der reichlichsten Sporenentwicklung und -Verbreitung des Pilzes zu jung oder zu alt sind.“

9. Eine ähnliche Betrachtung konnte ich im Herbst 1912 am Schloß in Wertheim machen. Hier standen äußerst stark befallene Spitzahorngebüsche, dazwischen Bergahorne, die nur schwach, zum Teil auch überhaupt nicht befallen waren, sowie Feldahorne — was man sonst nur selten findet — die völlig frei von dem *Rhytisma*-pilz zu sein schienen. Ein genaues Absuchen der Gebüsche ergab aber, daß auch die Feldahorne befallen waren, allerdings nur die untersten Blätter und nur an einzelnen Trieben, an anderen nicht.

Wir haben also an diesem in der Natur beobachteten Beispiel das feststellen können, was durch die später geschilderten Impfversuche experimentell gefunden wurde, daß *Rhytisma acerinum* von Spitzahornblättern auf Berg- und Feldahorn übergeht. Der schwache Befall der Berg- und Feldahorngebüsche ist einmal dadurch zu erklären, daß das von Spitzahornblättern stammende *Rhytisma acerinum* auf Spitzahornblätter wieder am leichtesten übergeht und dann wohl auch aus dem Umstände, daß nicht alle drei Ahornarten ihre Blätter gleichzeitig entfaltet haben. Es können dann nur die zur Zeit der Sporenaussaat im empfindlichsten Stadium sich befindlichen Blätter reichen Befall durch den Pilz aufweisen. Auch die Feuchtigkeitsverhältnisse, die bei ungleichzeitiger Blattentfaltung wechselnd gewesen sein können, spielen bei der Stärke des Befalls, wie wir später noch sehen werden, eine wesentliche Rolle und können zur Erklärung des verschieden starken Auftretens der *Rhytisma*-Flecke auf den genannten Ahornarten mit herangezogen werden.

b) Impfversuche im Freien.

Im November 1907 topfte ich zu Infektionszwecken Spitzahorne, Bergahorne und Feldahorne von 2—3 Jahren Alter ein und überwinterte die Pflanzen im Freien.

Ebenso wurden von *Rhytisma acerinum* befallene Blätter von *Acer platanoides* und *A. pseudoplatanus*, welche von der Waldseestraße bei Freiburg stammten, im Freien getrennt überwintert. Die Blätter wurden zu diesem Zweck in etwa 8—10 cm hoher Schicht in weite Blumentöpfe gelegt und mit Steinen beschwert.

Am 25. April 1908 wurden die Ahornbäume und Blätter in zwei räumlich weit getrennte Gruppen zusammengestellt und eingegraben. Unter den Ahorngruppen breitete ich reichlich Blätter einer der beiden Ahornarten aus

¹⁾ Fischer, E. d., Zur Kenntnis der Vegetation des Berner Oberlandes. Mitt. Naturforsch. Gesellsch. Bern 1909. Sep. p. 6.

²⁾ Herr Prof. Dr. E. d. Fischer - Bern hatte die Liebenswürdigkeit, mich hierauf aufmerksam zu machen, wofür ich auch an dieser Stelle verbindlichen Dank ausspreche.

und schützte sie durch ein Holzgitter vor dem Wegwehen. Damit die Blätter mit den Sklerotien nicht vertrockneten, blieb bis zur Blattentfaltung Anfang Mai Moos darauf liegen, das täglich begossen wurde.

Die Gruppe I, die mit den Sklerotien der Bergahornblätter infiziert werden sollte, bestand aus 4 Bergahorn-, 2 Spitzahorn- und 4 Feldahornbäumchen.

Die II. Gruppe enthielt auf den Töpfen Sklerotien der Spitzahornblätter und umfaßte 2 Spitzahorne, 5 Bergahorne und 4 Feldahorne.

In den letzten Tagen des April begannen die Blätter sich aus den Knospen zu entwickeln. Mitte Mai waren bei allen junge, frisch entfaltete Blätter vorhanden.

Durch braune Rüsselkäfer, die in großer Menge im Frühjahr 1908 auftraten, wurden zahlreiche junge Blätter schon Anfang Mai stark zerfressen und schließlich Anfang Juni abgeworfen, somit die Infektion sehr in Frage gestellt. Leider konnte ich dem Übel nicht steuern, da ich während dieser Zeit abwesend war.

Die nachfolgenden beiden Tabellen ergeben die Resultate der Infektion in den beiden zusammengestellten Gruppen:

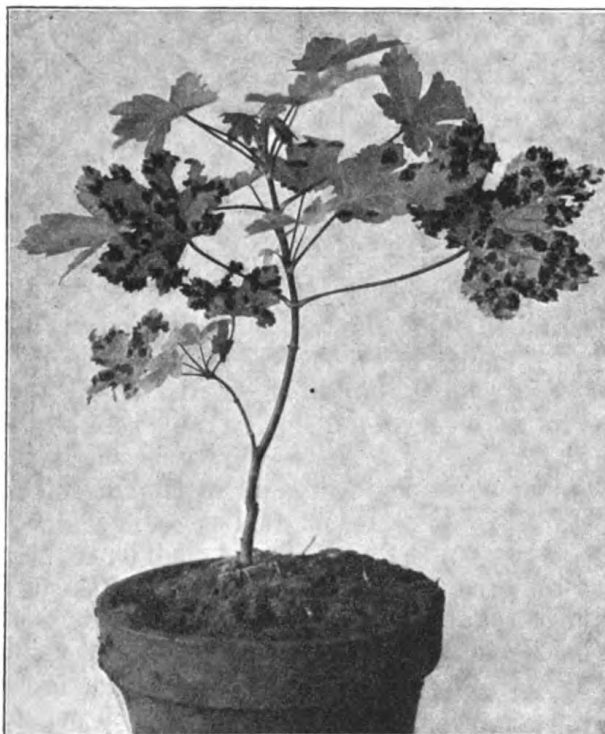


Fig. 1. Bergahornbäumchen, infiziert mit Sporen aus Bergahornblatt-Sklerotien. (Gruppe I. No. 2.)

Gruppe I.

Infektion mit den kleinen Sklerotien des Bergahorns von Freiburg.

No.	Infizierte Pflanze	Befall am		Bemerkungen
		24. VI.	7. X.	
1	Bergahorn	sehr stark	sehr stark	(Vgl. Abb. 1.)
2	"	stark	sehr stark	
3	"	stark	sehr stark	
4	"	0	0	
5	Spitzahorn	0	0	Alle Blätter fielen Anfang Juni ab; es bildeten sich dann wieder neue, die aber nicht mehr infiziert werden konnten.
6	"	0	0	
7	Feldahorn	0	0	
8	"	0	0	
9	"	0	0	
10	"	0	0	

Gruppe II.
Infektion mit den großen Sklerotien des Spitzahorns von Freiburg.

No.	Infizierte Pflanze	Befall am		Bemerkungen
		24. VI.	7. X.	
1	Spitzahorn	stark	0	Pflanze sehr klein, hat infizierte Blätter am 24. VI. abgeworfen. Nachreife zu schwarzen Sklerotien.
2	„	0	stark	Am 7. VII. sind die ersten Flecken wahrnehmbar. Pflanze 1 m hoch.
3	Bergahorn	unsicher	schwach	} Je 2—3 Infektionsflecken, an einer Pflanze am 7. X.
4	„	unsicher	schwach	
5	„	unsicher	schwach	
6	„	0	0	
7	„	0	0	} Zeigen am 7. VII. rote Flecken, am 7. X. fast alle stark infiziert, Flecken an einzelnen Stellen schon schwarz.
8	Feldahorn	0	stark	
9	„	0	stark	
10	„	0	stark	
11	„	0	stark	

Es ergibt sich also aus den Infektionsversuchen im Jahre 1908 folgendes:

1. Die kleinen Sklerotien der Bergahornblätter infizieren nur die Bergahorne, diese aber sehr stark. Spitzahorn und Feldahorn bleiben völlig frei von Infektionen. Weitere Versuche mußten zeigen, ob das nur ein Zufall war, oder ob es sich um eine Regelmäßigkeit handelte.

2. Die großen Sklerotien der Spitzahornblätter infizieren stark Spitzahorn und Feldahorn, Bergahorn dagegen nur teilweise und viel schwächer.

Die Inkubationszeit stellte sich bei Berg- und Spitzahorn kürzer heraus, als bei Feldahorn, bei welchem 2—3 Wochen später erst die ersten Infektionsflecken sichtbar wurden. Hier sind sie anfangs rötlich gefärbt, während sie bei Berg- und Spitzahorn gelbgrün erscheinen.

Durch die Beobachtungen im Herbst 1908 veranlaßt, habe ich, um im Frühjahr 1909 weitere Infektionsversuche ausführen zu können, folgende Runzelschorfe auf Ahornblättern in größerer Menge gesammelt und in gleicher Weise, wie das Jahr zuvor, getrennt überwintert:

- | | |
|--|------------------|
| 1. große Flecken auf Spitzahorn von Freiburg | } Waldseestraße. |
| 2. große Flecken auf Bergahorn von Freiburg | |
| 3. kleine Flecken auf Bergahorn von Freiburg | |
| 4. kleine Flecken auf Bergahorn von Durlach. | |

Die Infektionsversuche sollten zeigen:

I. ob der Bergahornpilz und der Spitzahornpilz sich, wie im Jahr zuvor, verschieden verhielten,

II. ob der Pilz, welcher die großen Flecken auf Bergahornblättern erzeugt, identisch ist mit dem Pilz der Spitzahornblätter und

III. ob der Pilz, welcher kleine Flecken auf Bergahornblättern bei Durlach erzeugt, sich biologisch gleich verhält, wie der von Freiburg.

Das Frühjahr 1909 war für die Entwicklung der Sklerotien sehr ungünstig, denn bis 24. April war es warm. Infolgedessen streuten die Ascis schon Ende April ihre Sporen aus, zu einer Zeit, in welcher die Ent-

wicklung der Ahornblätter teilweise noch sehr weit zurück war¹⁾, so daß bei manchen Versuchspflanzen der Erfolg der Infektion in Frage stand. Vom 25. April bis 4. Mai folgten kalte Tage mit anhaltendem Regen. Die Blattentwicklung wurde dadurch gehemmt. Die Folge davon war, Infektion der Pflanzen, welche ihre Blätter zu dieser Zeit schon entfaltet hatten und beinahe Erfolglosigkeit bei den übrigen Versuchspflanzen. Vom 4. Mai ab wurde es wieder wärmer und gleichzeitig war es sehr windig. In dieser Zeit konnten nur noch ganz wenige Sklerotien angetroffen werden, die ihre Sporen noch nicht ausgestoßen hatten.

Im folgenden gebe ich die Zusammenstellung der Infektionsresultate der vier Gruppen des Jahres 1909.

Außer den 1908 angepflanzten 3 Bergahornarten wurden noch einige fremdländische in die Untersuchung mit einbezogen.

Die Sklerotien wurden am 19. April unter den Versuchspflanzen ausgebreitet und genau wie im Vorjahre, mit Holzstäbchen bedeckt, damit sie der Wind nicht wegnehmen konnte. Alle 4 Gruppen waren an räumlich weit entfernten Stellen des Versuchsfeldes eingegraben worden.

Gruppe I.

Infektion mit den großen Sklerotien des Spitzahornpilzes von Freiburg.

No.	Infizierte Pflanze	Befall am		Bemerkungen
		26. VI.	7. X.	
1	Spitzahorn	6 Flecken	6 Flecken	sehr große Pflanze.
2	„	4 „	4 „	Kleine Pflanze mit vielen Blättern.
3	„	0	0	Blätter z. Z. der Infektion noch nicht entfaltet.
4	Bergahorn	0	2 Flecken	
5	„	0	1 Fleck	Vgl. Bemerkung zu No. 3.
6	„	0	7 Flecken	
7	„	0	1 Fleck	Vgl. Bemerkung zu No. 3.
8	Feldahorn	0	2 Flecken	
9	„	0	0	

Gruppe II.

Infektion mit den großen Sklerotien der Bergahornpilze von Freiburg.

No.	Infizierte Pflanze	Befall am		Bemerkungen
		26. VI.	7. X.	
1	Bergahorn	0	0	Infektion unmöglich, weil z. Z. der Sporenentleerung die Blätter noch nicht entwickelt waren.
2	„	0	2 große Flecken	Am 9. IX. zuerst beobachtet.
3	Spitzahorn	0	0	} Vgl. Bemerkung zu No. 1.
4	„	0	0	
5	„	0	0	
6	Feldahorn	0	0	
7	„	0	0	

¹⁾ Der anhaltende kalte Winter 1908/1909 schadete zahlreichen Versuchspflanzen bedeutend. Einige, die im Herbst frisch gesetzt waren, erfroren, der Rest entfaltete die Blätter sehr ungleich.

Mit den gleichen Sklerotien wurden noch *Acer dasycarpum*, *A. glabrum* und *A. Ginnala* in je zwei Exemplaren zu infizieren versucht. Die Infektion war jedoch nur bei einem Exemplar von *A. dasycarpum* (27. VII.) erfolgreich.

Gruppe III.

Infektion mit den kleinen Sklerotien des Bergahornpilzes von Freiburg.

No.	Infizierte Pflanze	Befall am		Bemerkungen
		26. VI.	7. X.	
1	Bergahorn	0	0	Infektion unmöglich, weil z. Z. der Sporenentleerung die Blätter noch nicht entwickelt waren.
2	„	stark	15 Flecken	
3	„	0	0	
4	Spitzahorn	0	0	
5	„	0	0	
6	„	0	0	
7	„	0	0	
8	Feldahorn	0	0	
9	„	0	0	

Gruppe IV.

Infektion mit den kleinen Sklerotien des Bergahornpilzes von Durlach.

No.	Infizierte Pflanze	Befall am		Bemerkungen
		26. VI.	7. X.	
1	Bergahorn	schwach	3 Flecken	Blätter z. Z. der Sporenentleerung noch nicht entwickelt. Frühzeitig sehr reiche Blattentwicklung nahe dem Erdboden!
2	„	0	1 Fleck	
3	„	0	0	
4	Spitzahorn	0	0	
5	„	0	0	
6	„	0	0	
7	Feldahorn	0	0	
8	„	0	0	

Zu Gruppe IV wurden ferner noch gestellt je zwei Exemplare von *Acer dasycarpum*, *A. glabrum* und *A. Ginnala*. Alle drei Arten wurden aber vom Bergahornpilz nicht infiziert.

Auch im Jahre 1910 wurden Infektionsversuche mit Sklerotien des Spitzahorns von Freiburg und solchen des Bergahorns von Durlach (200 m Höhe) und von Hinterzarten (900 m Höhe) angestellt. Bei dem frostfreien Winter 1909/10 entwickelten sich aber nur die Bergahorn-Sklerotien von Hinterzarten und die des Spitzahorns von Freiburg normal, während die des Bergahorns von Durlach, z. T. bei der Überwinterung verfaulten oder von verschiedenen Tieren aufgefressen wurden. Darum waren auch nur in den Parzellen Infektionen zu verzeichnen, die mit den Sklerotien von Freiburg und Hinterzarten belegt waren.

Da die erhaltenen Resultate lediglich Bestätigungen der früheren waren, will ich sie hier nicht im einzelnen aufführen.

Die Spitzahornsklerotien von Freiburg wurden unter eine Gruppe von 3 Spitzahorn-, 7 Bergahornbäumchen und je 2 Exemplaren von *Acer*

campestre, *A. Ginnala*, *A. dasycarpum* und *A. glabrum* Mitte April ausgelegt.

Die Infektion glückte nach den Feststellungen im Oktober bei 2 Spitzahorn- und bei 4 Bergahornbäumchen. Diese hatten aber nur je einen Fleck. Die übrigen Ahornarten waren nicht befallen.

Die Sklerotien der Bergahornblätter von Hinterzarten wurden unter zwei Gruppen von Versuchspflanzen gelegt, die aus 12 Spitzahornen, 7 Bergahornen und 4 Feldahornen bestanden. Alle 7 Bergahorne waren Mitte Juli überaus stark von dem *Rhytisma*-Pilz befallen, eine Pflanze, die bis Ende Mai 30 Blätter entwickelt hatte, zeigte z. B. 140 Flecken, dagegen war nicht einer der 12 Spitz- und 4 Feldahorne infiziert.

Wie schon erwähnt, fanden sich im Höllental Spitz- und Bergahorne, die alljährlich reichlich von *Rhytisma* befallen waren. Es war darum die Frage zu untersuchen: Ist der Pilz auf Bergahorn derselbe, wie auf Spitzahorn oder hat jede Baumart einen besonderen *Rhytisma*-Pilz, wie wir es z. B. an den Ahornbäumen an der Waldseestraße bei Freiburg (Beispiel 5 auf p. 71) gefunden hatten?

Zur Klarlegung dieser Frage wurden Bergahornblätter mit Sklerotien Ende April 1912 unter 2 Gruppen von Ahornbäumchen gelegt, die im ganzen 6 Spitzahorne, 6 Bergahorne und 4 Feldahorne enthielten. Die Besichtigung der Gruppe Ende Juli ergab 22 Flecken an Spitzahorn- und 13 Flecken an Bergahornblättern. Beide waren also in dem Verhältnis wie im Höllental von dem Pilz befallen worden. Am Feldahorn fand sich nur ein Fleck. Es mußte sich in dem erwähnten Falle also um den Spitzahornpilz handeln, der auf den Bergahorn übergegangen war, wie wir es bei Versuchen früher schon festgestellt hatten. Daß die Verhältnisse nicht etwa umgekehrt lagen und der Bergahornpilz auf den Spitzahorn übergegangen war, ergibt sich aus den zahlreichen früheren Versuchen und den Beobachtungen im Freien, wonach das nie zutrifft.

Untersuchungen über *Rh. acerinum* auf Feldahorn konnte ich erst vom Jahre 1911 an anstellen, da es mir erst im Herbst 1910 gelang, reich von *Rhytisma* befallene Feldahorne in der Nähe von Mosbach (in Baden) aufzufinden. Ich sammelte davon Mitte September und Mitte Oktober und überwinterte die Blätter in zugebundenen Blumentöpfen im Freien. Es stellte sich aber heraus, daß nur die im Oktober gesammelten Blätter lebenskräftige Sklerotien ausgebildet hatten, während bei den zu früh gesammelten, weil ein Abschluß der Nährstoffzufuhr im Blatte noch nicht eingetreten war, die nötige Sklerotienausbildung auch noch nicht erfolgt war, so daß sie über Winter zugrunde gingen. Die sklerotientragenden Feldahornblätter wurden dann unter eine Gruppe von Ahornbäumchen gelegt, um die Infektionswirkung an verschiedenen Ahornarten zu studieren. Das Resultat war am 14. August wie folgt: (S. Tabelle auf p. 78.)

Hierzu ist noch folgendes zu bemerken:

Der Sommer 1911 war in Augustenberg sehr trocken, so daß ein Teil der Versuchspflanzen, die alle in Töpfe eingepflanzt waren, verdorrten. Die große anhaltende Trockenheit macht es wahrscheinlich, daß nur wenig Sporen ausgeschleudert wurden, die dann z. T. nach dem Ausschleudern vertrockneten. Darum ist im allgemeinen der Befall schwach geblieben, er genügte aber, um den biologischen Wert von *Rh. acerinum* auf Feldahornblättern zu erkennen. Alle Spitzahornbäumchen und alle Feld-

Infektion mit Sporen des Feldahorn-Rhytismapilzes von Mosbach.

No.	Infizierte Pflanzen	Befall am 14. August	Bemerkungen
1	Spitzahorn	9 Flecken	Pflanze ist größtenteils verdorrt.
2	"	4 "	
3	"	3 "	
4	"	5 "	
5	"	1 Fleck	
6	Bergahorn	kein Befall	} Beide Stöcke standen sonnig.
7	"	" "	
8	"	" "	
9	Feldahorn	5 Flecken	
10	"	2 "	
11	"	1 Fleck	
12	Acer dasycarpum	kein Befall	
13	"	" "	
14	Acer Ginnala	" "	
15	" "	" "	

ahorne wurden befallen, nicht aber Bergahorne und fremdländische Ahorne. Wir dürfen daraus schließen, daß sich auf dem Feldahorn ebenfalls eine biologische Art zu spezialisieren beginnt, die zwar nicht so ausgeprägt ist, wie die auf Bergahornblättern, sich aber immerhin von der auf Spitzahornblättern lebenden *Rhytisma*-Art dadurch unterscheidet, daß sie bei meinen Versuchen Bergahornblätter nicht befallen hat.

Möglicherweise lassen sich unter ganz günstigen Bedingungen mit *Rhytisma* von Feldahornblättern, genau wie mit dem Pilz von Spitzahornblättern auch Bergahornblätter schwach infizieren. Solange das aber nicht glückt, müssen wir einen Teil der *Rhytisma*-Pilze auf Feldahorn als eine spezialisierte Form von *Rh. acerinum* ansehen. Zum mindesten ist aus dem Nichtbefall der Bergahorne in meinem Versuche zu schließen, daß der *Rhytisma*-Pilz von Feldahornblättern in der Stärke des Befalls zwischen Spitzahorn und Feldahorn einerseits und Bergahorn andererseits große Unterschiede macht.

c) Ergebnis der Infektionsversuche im Freien.

Die Infektionsversuche der Jahre 1909 und 1912 haben das bestätigt, was im Jahre 1908 gefunden wurde. Der Pilz, welcher auf *Acer platanoides* die großen Flecken bildet (vgl. Taf. II, Fig. 3), hat eine große Verbreitung auch auf anderen *Acer*-Arten. Er bevorzugt zwar *A. platanoides*, kommt aber, wenn schon viel seltener und spärlicher, auch auf *Acer campestre*, *A. pseudoplatanus* und *A. dasycarpum* vor. Diesen Pilz nenne ich *Rh. acerinum* fo. spec. *platanoides*.

Auf den Blättern des Bergahorns kommen zweierlei *Rhytisma*-Arten vor, die aber morphologisch so ähnlich sind, daß sie bisher nicht getrennt worden sind.

Einmal finden wir auf dem Bergahorn das gewöhnliche *Rhytisma acerinum*, welches 1,5—2 cm große Flecken bildet und vor allem Spitzahorne bevorzugt, aber auch gelegentlich auf Bergahorn übergeht. Im Freien ließ sich das *R. acerinum* auf Bergahorn in Menge in der Ra-

vennaschlucht im Höllental sammeln. Dieses Material gab darüber Aufschluß, wie sich der Pilz beim Rückimpfen auf verschiedene Ahornarten verhält. Es wurde festgestellt, daß dieses *Rhytisma acerinum* fo. *platanoides* am stärksten den Spitzahorn befällt, nahezu ebenso stark den Bergahorn, schwächer dagegen den Feldahorn (nur bei Versuchen im Freien glückte eine Infektion. Vergl. aber auch p. 81). Damit ist sicher gestellt, daß sich der Pilz auf Bergahornblättern vom Höllental nicht von dem auf Spitzahorn unterscheidet.

Zweitens treffen wir auf Bergahornblättern einen *Rhytisma* pilz, der unter normalen Bedingungen 0,5—1 cm im Durchmesser breite, dicke Flecken verursacht. Er unterscheidet sich scharf durch sein biologisches Verhalten von dem eben genannten *Rh. acerinum* fo. *platanoides*, denn er befällt stets nur, ganz gleichgültig woher das Material stammt, den Bergahorn, diesen aber sehr stark. Nie läßt sich der Pilz auf Spitzahorn oder Feldahorn übertragen.

Neben diesen scharfen biologischen Unterschieden sind auch weniger scharfe morphologische vorhanden, die allerdings nicht immer diese Art zu erkennen gestatten. Vor allem sind für sie die gehirnartig-gerunzelten, dicken Sklerotien mehr oder weniger charakteristisch. (Vergl. Tafel II, Fig. 3.) Ihres ausschließlichen Vorkommens auf *Acer pseudoplatanus* wegen nenne ich diese biologische Art *Rhytisma pseudoplatani*.

Auf Feldahornblättern lebt, wie oben erwähnt, gelegentlich der Pilz, der sonst die Spitzahornblätter stark befällt, also das gewöhnliche *Rh. acerinum*. Versuche, den Spitzahornpilz auf den Feldahorn zu übertragen, glückten im Freien in den Jahren 1908 (Gruppe 2) und 1909 (Gruppe 1). (Im Glashause wurden sie bisher, wie später erwähnt, noch nicht ausgeführt, dagegen glückte im Glaskasten die Übertragung von *Rh. acerinum* fo. *platanoides* von Bergahornblättern auf Feldahorn.) Die Frage, wie sich der *Rhytisma* pilz, der von Spitzahornblättern auf Feldahornblättern übergegangen ist, beim Rückimpfen verhält, ist aus Mangel an geeignetem Material bisher nicht zu lösen gewesen. Wahrscheinlich werden die Verhältnisse ähnlich liegen, wie bei *Rh. acerinum* fo. *platanoides* von Bergahornblättern; es werden also sowohl Spitzahorn, wie Berg- und Feldahorn befallen werden.

Der *Rhytisma* pilz, den man gewöhnlich an Feldahornblättern antrifft, scheint von dem eben erwähnten biologisch verschieden zu sein, was sich daraus ergibt, daß er neben Feldahorn wohl Spitzahorn, nie aber Bergahorn befällt.

Ich nenne ihn darum vorderhand *Rh. acerinum* fo. *spec. campestris*.

d) Impfversuche im Gewächshaus.

Die bisher geschilderten Impfversuche wurden absichtlich in großem Umfange im Freien angestellt, obwohl hierbei ungewünschte Infektionen durch Zuflug von Sporen stattfinden könnten. Die Freilandversuche hatten aber den Vorteil, daß völlig normale Pflanzen zur Infektion verwendet wurden und nicht die meist etwas zartblättrigen Gewächshauspflanzen. Um den eben gemachten Einwand, daß Fremdinfectionen stattgefunden haben könnten,

zu beseitigen, stellte ich in den Jahren 1911 und 1912 noch eine Anzahl Impfversuche an Gewächshauspflanzen an.

Zu diesem Zwecke wurden reife, im Freien in Leinwandbeuteln überwinterte *Rhytisma*-Sklerotien abgeschabt, in steriles Wasser übertragen und diese Sporenaufschwemmung mittels eines Pinsels auf die Versuchspflanzen gebracht. Nach dem Impfen kamen die Pflanzen unter Glaskästen. Im übrigen wurde in dem Vegetationsraum 2 Wochen lang von der Infektion ab, die Luft feucht gehalten.

Da mir im Jahre 1911 nur ungenügendes Impfmateriel zur Verfügung stand, konnten nur wenige Versuchsreihen Resultate ergeben, die im folgenden angeführt sind:

I. Geimpft mit Sporen aus Sklerotien von Spitzahornblättern
am 25. April 1911.

No.	Geimpft auf	Befall am 6. Juni	Bemerkungen
1	Spitzahorn	4 Flecken	Die Pflanze starb ab.
2	"	2 "	
3	Bergahorn	unsicher	
4	"	kein Befall	
5	Feldahorn	" "	

II. Geimpft mit Sporen aus Sklerotien von Bergahornblättern (*Rh. pseudoplatani*)
von Durlach, am 28. April 1911.

No.	Geimpft auf	Befall am 6. Juni	Bemerkungen
1	Spitzahorn	0	Die Pflanze wurde mit Sporen enthaltendem Wasser ganz eingepinselt.
2	"	0	
3	"	0	
4	Bergahorn	6 Flecken	
5	"	reichlich befallen	
6	Feldahorn	0	
7	"	0	

Im Jahre 1912 stand mir mehr und vor allem gut ausgereiftes Sporenmateriel zur Verfügung, so daß die nötigen Ergänzungen zu den Impfversuchen des Jahres 1911 nachgeholt werden konnten. Im folgenden sind sie angeführt:

III. Geimpft mit Sporen aus Sklerotien von Spitzahornblättern vom Höllental,
am 8. Mai 1912.

No.	Geimpft auf	Befall am 17. Juli	Bemerkungen
1	Spitzahorn	22 Flecken	Die reifen Sklerotien wurden trocken auf die zu infizierenden Blätter aufgedrückt.
2	Bergahorn	11 Flecken	Die Blätter wurden mit Wasser, das Sporen enthielt, bepinselt.

IV. Geimpft mit Sporen aus Sklerotien von Bergahornblättern von Durlach
(*R. h. pseudoplatani*) am 30. April 1912.

No.	Geimpft auf	Befall am 17. Juli	Bemerkungen
1	Bergahorn	13 Flecken	—
2	"	3 Flecken	—
3	Spitzahorn	0	—
4	Feldahorn	0	—

V. Geimpft mit Sporen aus Sklerotien von Bergahornblättern vom Höllental
(*R. h. acerinum fo. platanoides*) am 8. Mai 1912.

No.	Geimpft auf	Befall am 17. Juli	Bemerkungen
1	Spitzahorn	11 Flecken	Die ersten Sklerotien zeigten sich erst am 12. August. Die Pflanze war durch Meltau-befall geschwächt.
2	Bergahorn	6 Flecken	
3	Feldahorn	16 Flecken	

VI. Geimpft mit Sporen aus Sklerotien von Feldahornblättern von Mosbach
(*R. h. acerinum fo. campestris*) am 11. April 1912.

No.	Geimpft auf	Befall am 17. Juli	Bemerkungen
1	Spitzahorn	0	Pflanze abgestorben, weil Spinnmilben die Blätter befielen.
2	"	2 Flecken	
3	Bergahorn	0	
4	"	0	
5	"	0	
6	"	0	
7	Feldahorn	1 Fleck	
8	"	7 Flecken	

Die Impfversuche an den unter Glaskästen gestellten Ahornarten haben also die bei den Freilandimpfversuchen erhaltenen Resultate bestätigt, so daß ich auf die Zusammenfassung auf p. 78 verweisen kann. Nur über das Verhalten von *Rhytisma* der Spitzahornblätter auf Feldahorn fehlen bestätigende Impfversuche im Glaskasten, da der im Jahre 1911 angestellte Versuch wohl wegen zu schlechten Impfmateri- als nicht glückte. Es wird sich vielleicht später Gelegenheit bieten, diesen Versuch zu wiederholen. Wir dürfen aber aus dem obenstehenden Versuch V Nr. 3 schließen, daß ebenso wie *R. h. acerinum* von Bergahornblättern den Feldahorn stark infiziert, das gleiche auch bei den Spitzahorn-*Rhytisma* der Fall sein wird, wie die Versuche im Freien gezeigt haben.

Noch nicht untersucht war die Frage, ob die Infektion auf beiden Blattflächen oder nur auf einer erfolge. Am wahrscheinlichsten war, daß die Blattunterseiten für die keimenden Sporen die Eingangspforten darstellen, da sich hier bei einer Blattfläche von ca. 1 qdm, was ungefähr der Größe eines aus-

gewachsenen Ahornblattes entspricht, rund 2 Millionen Spaltöffnungen vorfinden, während sie auf der Blattoberseite fehlen. Außerdem findet man häufig die *Rhytisma* sklerotien an den Rändern der Ahornblätter (vgl. Abb. 2). Auf der Unterseite der Blattzipfel und Blattränder, die leicht rückwärts gekrümmt sind, bleibt nach Regen das Wasser am längsten haften; für die Keimung der Sporen und für die Infektion bieten sich hier demnach die günstigsten Bedingungen, da auf der Unterseite der Blattzipfel Spaltöffnungen in besonders großer Zahl vorhanden sind.



Fig. 2. Links Bergahorn — rechts Spitzahornblatt vom Höllental, mit Sklerotien an den Blatträndern. Frühjahr 1912.

Da nach den Untersuchungen von Ruhland und von Faber¹⁾, die dann durch die umfangreichen Versuche Müller-Thurgaus²⁾ sowie anderer Forscher³⁾ bestätigt wurden, auch die *Plasmopara viticola* fast ausschließlich von der Unterseite aus in die Blätter eindringt und von Faber⁴⁾ neuerdings genau gleiches bei dem Rostpilz *Hemileia vastatrix* nachweisen konnte, war die Möglichkeit vorhanden, daß *Rhytisma* pilze sich ähnlich verhielten.

Zur Feststellung des Verhaltens wurden in den Jahren 1910—1912 Topfexemplare verschiedener Ahornarten teils auf der Blattober-, teils auf der Blattunterseite mit sporenhaltigen Wassertröpfchen geimpft.

Die infizierten Pflanzen kamen zusammen mit einer Schale Wasser etwa eine Woche unter eine Glasglocke zu stehen. Über die Art der Versuche und die erhaltenen Resultate geben die nachstehenden 3 Tabellen Auskunft:

¹⁾ Ruhland u. v. Faber, Zur Biologie der *Plasmopara viticola*. (Ber. üb. d. Tätigk. d. Kaiserl. Biolog. Anst. f. Land- u. Forstwirtschaft. im Jahre 1908. [1909.] p. 19.)

²⁾ Müller-Thurgau, Infektion der Weinrebe durch *Plasmopara viticola*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 29. 1911. p. 683.)

³⁾ Vgl. hierzu meine Arbeit: Die neuesten Forschungen über die Biologie und Bekämpfung der *Peronospora* krankheit der Reben. (Mitt. Deutsch. Weinbauver. 1912. No. 4.)

⁴⁾ v. Faber, Zur Infektion und Keimung der Uredosporen von *Hemileia vastatrix*. (Ber. Deutsch. bot. Gesellsch. Bd. 28. 1910. p. 138—147.)

1910.

No.	Versuchspflanze	Geimpft mit Sporen von	Infiziert auf	Befund am 20. Juni
1	Bergahorn	R h. pseudoplatani	Oberseite	Keine Infektion.
			Unterseite	4 große, gelbe Flecken, mit teilweise schwarzen Punkten.
2	Bergahorn	R h. pseudoplatani	Oberseite	Keine Infektion.
			Unterseite	Ein Blatt mit 2 Flecken.
3	Spitzahorn	R h. acerinum	Oberseite	1 Fleck.
			Unterseite	Auf 1 Blatt 4 große Flecke.
4	Spitzahorn	R h. acerinum	Oberseite	Keine Infektion, wurde später als die übrigen infiziert.
			Unterseite	

1911.

No.	Versuchspflanze	Geimpft mit Sporen von	Infiziert auf	Befund am 16. Juni
1	Bergahorn	R h. pseudoplatani	Oberseite	0
			Unterseite	1 Fleck
2	Bergahorn	R h. pseudoplatani	Oberseite	0
			Unterseite	6 Flecken
3	Spitzahorn	R h. acerinum	Oberseite	0
			Unterseite	7 Flecken
4	Spitzahorn	R h. acerinum	Oberseite	0
			Unterseite	14 Flecken
5	Bergahorn	R h. acerinum	Oberseite	0
			Unterseite	3 Flecken

Neben den geschilderten Versuchen wurden noch eine Anzahl solcher Ahornarten auf der Blattober- und -unterseite geimpft, die nach dem früher Gesagten nicht befallen werden konnten, wie z. B. Spitzahorn mit R h. pseudoplatani. Diese Versuche dienten gleichzeitig zur Bestätigung der schon mitgeteilten Befunde über die Spezialisierung.

Als Resultat ergibt sich aus den Infektionsversuchen auf den Blattober- und Unterseiten: Eine Ansteckung durch Rhytisma pilze erfolgt im allgemeinen nur dann, wenn das im Wasser verteilte Sporenmaterial auf die Blattunterseiten gebracht wird. Die Sporen der Rytisma pilze von verschiedenen Ahornarten verhielten sich hierbei völlig gleich und ebenso war es gleichgültig, auf welche Ahornart die Sporen gelangten; wenn überhaupt eine Infektion möglich war, glückte sie auf der Blattunterseite, wo die Keimschläuche offenbar, wie bei vielen anderen Parasiten, durch die Spaltöffnungen in das

6*

1912.

No.	Versuchspflanze	Geimpft mit	Geimpft auf	Befund am 4. Juli
1	Spitzahorn	<i>R. h. acerinum</i> (von Spitzahorn)	Oberseite	7 Flecken ¹⁾
			Unterseite	15 Flecken
2	Bergahorn	<i>R. h. pseudoplatani</i>	Oberseite	0
			Unterseite	13 Flecken
3	Bergahorn	<i>R. h. pseudoplatani</i>	Oberseite	0
			Unterseite	3 Flecken
4	Feldahorn	<i>R. h. acerinum</i> fo. <i>campestris</i>	Oberseite	0
			Unterseite	1 Fleck
5	Feldahorn	<i>R. h. acerinum</i> fo. <i>campestris</i>	Oberseite	0
			Unterseite	7 Flecken
6	Spitzahorn	<i>R. h. acerinum</i> fo. <i>campestris</i>	Oberseite	0
			Unterseite	2 Flecken.

Blatt eindringen. Den Beweis hierfür konnte ich allerdings durch direkte Beobachtung bisher nicht erbringen, weil nur ein geringer Prozentsatz der Sporen auskeimt und es deshalb schwer hält das Eindringen des Schlauches zu beobachten.

Von der eben geschilderten Ansteckung durch die Blattunterseiten gibt es selten eine Ausnahme, wobei auch eine Infektion von der Blattoberseite aus erfolgt, wie z. B. Versuch 3 des Jahres 1910. Ob hier ein Versuchsfehler vorliegt, bleibt vorläufig unentschieden.

Fast regelmäßig tritt eine Ausnahme von eben geschilderten Ansteckungen durch die Blattunterseiten ein, wenn man reife Sklerotien auf die Oberseiten von Ahornblättern kräftig aufdrückt (vgl. Versuch 1 des Jahres 1912), offenbar weil bei dem Aufdrücken die Epidermis durch die rauhen Sklerotien verletzt wird, wodurch der Keimschlauch die Möglichkeit erlangt, in das Innere des Blattes einzudringen. Daß in der Tat beim Aufdrücken der harten Sklerotien Verletzungen auf der Blattoberseite entstehen, ließ sich später an den Blättern feststellen, da an den betreffenden Stellen kleine Teile des Blattgewebes abstarben.

IV. Bemerkungen über das biologische Verhalten anderer Rhytismapilze.

Bei meinen Impfversuchen wurde *R. h. punctatum* nicht mitberücksichtigt, weil mir von diesem Pilze zur geeigneten Zeit kein Infektionsmaterial zur Verfügung stand. Ich muß mich deshalb hier auf Beobachtungen in der Natur und auf morphologische Untersuchungen beschränken.

In Rabenhorsts Kryptogamenflora schreibt Rehm von dieser Art: „Entspricht bezüglich der Entwicklung ganz *R. h. acerinum*, mit welchem Tulasne (Sel. Fung. Carp. III, p. 117) diese Art als Form zusammenbringen. Dagegen halte ich in Übereinstimmung mit Fuckel (Symbol. Myc. p. 264) dieselbe für völlig selbständig; sie entbehrt immer

¹⁾ Die Sporen wurden durch Aufdrücken reifer Sklerotien auf die Blattoberseite gebracht.

des dicken, sklerotiumartigen Lagers, ihre Apothezien sind nie völlig verschmolzen und gleichen sehr denen von *Lophodermium*, mit welchem sie in nächster Verwandtschaft steht, ferner sind die Sporen nur halb so lang als die von *Rh. acerinum*.“

Während diese Auffassung jetzt allgemein angenommen ist, möchte ich nach meinen Beobachtungen glauben, daß die Verhältnisse etwas anders liegen, als Reh m angibt. Die Sporenlänge ist bei den *Rhytisma*-Arten überaus wechselnd, selbst in wohlentwickelten Sklerotien finden sich Unterschiede von 1/3. J. Müller wies schon darauf hin, daß je nach der Entwicklung der Sklerotien auch die Sporen in der Länge schwanken. Bei *Rh. punctatum* sind nun aber die Sklerotien besonders klein und darum wohl auch die Sporen. Beim Untersuchen reichlichen Materials von *Rhytisma* a befallenen Bergahornblättern gelingt es aber nicht, eine scharfe Grenze in der Größe der Sklerotien zu finden, vielmehr sind Übergänge von den nur 1 mm breiten bis zu den von 10—15 mm Durchmesser zu finden. Bei starkem Befall von *Rhytisma pseudoplatani* erhält man in der Nähe des Bodens Blattflecken von der Größe des *Rhytisma punctatum* (vgl. Taf. I, Fig. 1) und weiter oben die normalen Sklerotien von etwa 10 mm Durchmesser.

Ich vermute darum und hoffe, das, sobald ich geeignetes Material erhalte, noch durch Impfversuche bestätigen zu können, daß zwischen *Rh. punctatum* und *Rh. pseudoplatani* nur morphologische Unterschiede vorhanden sind, aber keine spezifischen, die sich auch im biologischen Verhalten des Pilzes äußern müßten. Also mit andern Worten: *Rh. punctatum* scheint nur eine durch besondere Bedingungen veranlaßte Form der biologischen Art *Rh. pseudoplatani* zu sein.

In der Heimat des *A. saccharinum*, in Nordamerika, wird diese Ahornart nach F. C. Stewart¹⁾ ebenso wie *Acer rubrum* reichlich von *Rhytisma* befallen. Vor allem auf Long Island (New-York) sollen an einer Ahornallee, die hauptsächlich aus *Acer platanoides* und *A. saccharinum*, in geringerer Zahl aus *A. pseudoplatanus* gebildet wird, nur die *A. saccharinum*-Bäume *Rhytisma*-Flecken aufweisen, nicht aber eine der beiden anderen Ahornarten.

Daraus dürfen wir den Schluß ziehen, daß auf *A. saccharinum* ein spezialisierter *Rhytisma*-Pilz vorkommt, der allem Anscheine nach eine besondere biologische Art darstellt. Ohne daß Impfversuche vorliegen, möchte ich diese Frage vorderhand aber nicht endgültig entscheiden.

Ebenso ist noch experimentell zu prüfen, wie sich das in Nordamerika auf *Acer rubrum* nicht selten auftretende *Rhytisma acerinum* biologisch verhält²⁾.

Nach von Höhnel³⁾ kommt in Bosnien ein als *Rhytisma acerinum* bezeichneter Pilz auf *Acer obtusatum* vor. Ob *Rh. acerinum* an dem Fundorte auf *A. obtusatum* übergeht, ist aus der Angabe nicht ersichtlich. Also auch hier müssen weitere Beobachtungen im Freien oder noch besser Impfversuche, die Frage, ob und in welcher Weise hier eine Spezialisierung vorhanden ist, zu klären versuchen.

¹⁾ Stewart, F. C., New York Agricultural Experiment Station Geneva. Bull. No. 328. 1910. Notes on New York plant diseases I. p. 364.

²⁾ Saccardo, Sylloge Fungorum. Bd. 8. p. 753 gibt *Rh. acerinum* von *Acer rubrum* an, ebenso Stewart l. c.

³⁾ von Höhnel, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie etc. Bd. 1. 1912. p. 221.

Wenn also auch die Biologie der Ahorn-Rhytisma-pilze noch nicht soweit geklärt ist, daß wir alle biologischen Rassen jetzt schon genau angeben könnten, so ist doch sicher gestellt, daß hier Spezialisierung, entgegen den bisherigen Angaben, ebenso vorhanden ist, wie bei andern rein parasitisch lebenden Pilzen.

Ebenso wie die Ahorn-Rhytisma-Arten, dürfen auch die auf Weidenblättern vorkommenden in biologische Rassen sich gliedern lassen. Eine solche Vermutung wurde zuerst durch von Tubeuf geäußert¹⁾.

Bisher sind von den Autoren nachstehende Weiden-Rhytisma-Arten unterschieden worden:

1. *Rh. salicinum* (Pers.) auf den verschiedensten Weidenarten.
2. *Rh. symmetricum* (J. Müller) auf *Salix purpurea*.
3. *Rh. umbonatum* (Hoppe) auf *Salix caprea*.

Letztgenannte Art wird aber von Rehm²⁾ zu *Rh. salicinum* als Synonym gestellt; ob mit Recht, müßten Infektionsversuche ergeben. Ebenso muß untersucht werden, ob die auf zahlreichen Weidenarten vorkommenden Rhytisma-pilze alle zu *Rh. salicinum* gehören, wie man bis jetzt annimmt oder ob, was viel wahrscheinlicher ist, sie in biologische Arten zerlegt werden müssen.

Die alpinen Weiden, die häufig in bunter Artenzusammenstellung weit ausgedehnte Gestrüppe bilden und gar nicht selten von Rhytisma-pilzen befallen sind, sprechen für eine Spezialisierung, denn man findet oft die Blätter einer Art von den schwarzen, hier und da fast halbkugeligen Rhytisma-krusten bedeckt, während dicht daneben andere Arten gar nicht oder ganz wenig befallen sind. Impfversuche mit *Rh. salicinum* wären darum nötig. Ganz einfach werden diese Versuche nicht sein, weil die Bestimmung der Wirtspflanze schon Schwierigkeiten macht, zumal wenn es sich um Bastarde handelt, die bei alpinen Saliceten häufig der Fall ist, vorkommen.

Rehm³⁾ vermutet, daß auch *Rh. symmetricum* nur eine Form von *Rh. salicinum* darstellt, denn er sagt: „Ihre spezifische Trennung von *Rh. salicinum* dürfte nicht notwendig sein.“ Ich halte dagegen *Rh. symmetricum* schon wegen der auf beiden Blattseiten hervortretenden Sklerotien für eine wohl definierte Art. Infektionsversuche werden das sicher auch bestätigen. Außer auf *Salix purpurea* konnte ich *Rh. symmetricum* auch auf *Salix caprea* nachweisen. Die Art wird übrigens *Rh. amphigenum* (Wallr.) zu heißen haben, da Wallroth⁴⁾ den Pilz schon lange vor J. Müller beschrieben hat. Später wurde er dann von Schröter⁵⁾ nochmals neu benannt (*Rh. autumnale* Schröt.).

Wie aus dieser kurzen Übersicht zu entnehmen ist, sind wir zur Zeit über die Biologie der Weiden-Rhytisma-Arten noch in keiner Weise unterrichtet.

¹⁾ v. Tubeuf, Pflanzenkrankheiten. Berlin 1895. p. 258.

²⁾ Rehm, Rabenhorsts Kryptogamen-Flora. I. 3. p. 84.

³⁾ Rehm, l. c. p. 1213.

⁴⁾ Wallroth, Flora crypt. Germ. II. 1833. p. 411.

⁵⁾ Schroeter, Kryptogamen-Flora v. Schlesien. Bd. 3. 2. p. 173.

V. Abhängigkeit der Rhytismaerkrankung von der Witterung.

Die Impfversuche, welche ich mehrere Jahre hintereinander mit den *Rhytisma*-Pilzen angestellt habe, ließen erkennen, welchen großen Einfluß die Witterung auf die Entwicklung der Sklerotien und auf die Infektion ausübt.

Nach normalen Wintern waren im allgemeinen die Sklerotien im Frühjahr am schönsten entwickelt, vorausgesetzt, daß sie sich im Herbst gehörig ausbilden konnten. War dies nicht der Fall, z. B. wegen zu später oder zu reicher Infektion, dann war die Zahl der keimfähigen Sporen nur gering.

In einem frostfreien Winter, und wenn es dabei häufig regnete, wie z. B. im Winter 1909/10, verfaulten viele der Sklerotien, andere entwickelten sich im Frühjahr nicht weiter, so daß nur ein Teil keimfähig wurde. Es ist das von großer Bedeutung, weil sicher auch viele andere Pilze sich ähnlich verhalten werden. Ungünstigerweise kommt für die Sklerotien noch hinzu, daß sie im Sommer nicht immer völlig ausreifen können, wegen zu später Infektion, wie z. B. im Jahre 1909 und das dürfte zum Teil auch mitsprechen, wenn wir im Frühjahr 1910 nur wenige gut entwickelte Sklerotien antrafen. Von den ausgereiften Sklerotien aus Hinterzarten überwinterte auch in dem warmen Winter 1909/10 ein großer Teil gut und war infolgedessen auch infektiöskräftig.

Damit, daß die Sklerotien im Frühjahr infektiöskräftig sind und keimfähige Sporen enthalten, ist aber eine Infektion der Ahorne im Frühjahr noch nicht gesichert. Hauptsächlich kommt noch in Betracht, daß zur Zeit der Sporenreife, die bei Karlsruhe ungefähr in die Zeit vom 25. April bis 12. Mai fällt, die Witterung für die Ausbreitung und Keimung günstig ist und daß die Wirtspflanzen die Blätter schon entwickelt haben. Trifft die eine oder die andere Voraussetzung nicht zu, dann ist die Infektion erfolglos.

Zur Ausbreitung und Keimung der *Rhytisma*-Sporen ist feuchtes und warmes Wetter nötig, am besten also Regen abwechselnd mit Sonnenschein, weil dadurch, wie wir später sehen werden, die Sporen leichter ausgeschleudert werden. Sind die Sklerotien reif, und fällt ein warmer Regen, dann sind über Nacht alle aufgesprungen. Obwohl sicher verschiedene Umstände die Infektion beeinflussen, hat sich während mehrjähriger Beobachtung ergeben, daß man allein aus der Niederschlagsmenge zur Zeit der Infektion, also von Ende April bis Mitte Mai (bei ca. 200 m Seehöhe) auf die Stärke des Befalles mit großer Sicherheit schließen kann. Vorausgesetzt ist dabei, daß die Sklerotien in normalem Zustande in den Winter kamen. Beispielsweise war im Jahre 1907 der Befall stark, im Jahre 1908 sehr stark, im Jahre 1909 dagegen schwach und im Jahre 1910 wieder stark, allerdings mit der Einschränkung, welche der warme vorausgegangene Winter bedingte und worüber oben schon gesprochen wurde. Die Jahre 1911 und 1912 zeigten wieder nur spärliche Infektionen.

Um einen Überblick über die Niederschlagsmenge zu erhalten, wodurch der Zusammenhang zwischen dieser und der Stärke der Infektion klargestellt wird, sind auf der nächsten Seite (Fig. 3) die Niederschlagsmengen auf Augustenberg während der Zeit vom 25. April bis 12. Mai der Jahre 1907 bis 1912 graphisch dargestellt. Da von den Jahren 1907 und 1908 keine Aufzeichnungen von Augustenberg vorlagen, benutzte ich die von Karlsruhe, die nicht wesentlich verschieden sein werden.

Man ersieht aus der Darstellung, daß zwischen

der oben angegebenen Stärke der Infektion in den einzelnen Jahren und der Niederschlagsmenge zur Zeit der Ejakulation gleichlaufende Beziehungen vorhanden sind.

Zu dieser Zeit war es z. B. im Jahre 1909 sehr kalt und mäßig feucht, was für das Auftreten von Pilzkrankheiten ungünstig ist. In diesem Jahre traten auch andere Krankheiten verglichen z. B. mit 1908 anfangs nur spärlich auf, wie *Plasmopara viticola*, Eichenmehltau u. a. Die Infektion dehnte sich demgemäß im Jahre 1909 über lange Zeit aus, zumal im Juni reichlich Niederschläge fielen. Während die ersten *Rhytisma*-Flecken auf den Ahornblättern am 20. Juni beobachtet wurden, zeigten sich andere erst Ende September. Besonders beim Bergahorn blieben die Sklerotien darum auch kleiner, als in anderen Jahren. Dies konnte an verschiedenen Stellen beobachtet werden. Die Größe der Flecken kann also von Jahr zu Jahr schwanken.

Am besten ist das bei *Rh. pseudoplatani* zu erkennen. Bei üppigem Wachstum des Pilzes, verursacht durch reichliche Niederschläge

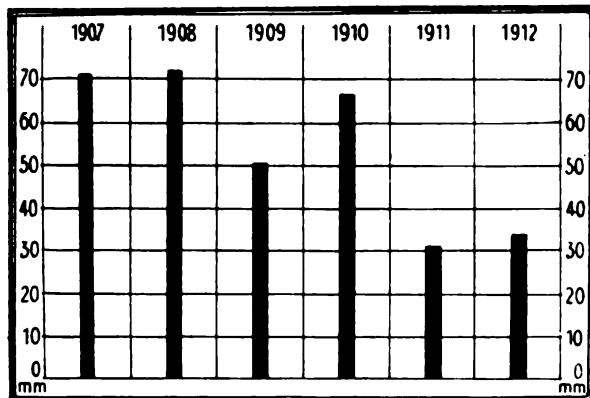


Fig. 3. Graphische Darstellung der Niederschläge vom 25. April bis 12. Mai in den Jahren 1907—1912.

und wenig Sonnenschein — wobei das Gewebe der Wirtspflanze zarter bleibt — werden die Sklerotien auf den Blättern größer als sonst, besonders wenn sie sich auf einer Blattrippe befinden. Solche Flecken gleichen dann ganz jenen, die durch Infektionen mit *Rh. acerinum* auf Bergahornblättern erhalten werden, obwohl sie einer biologisch ganz anderen Art angehören.

Bei schlechtem Wachstum, z. B. wegen zu großer Trockenheit, bleiben die Sklerotien

kleiner. *Rh. acerinum* kann dann auf Bergahorn ebenso kleine Flecken bilden, wie es für *Rh. pseudoplatani* die Regel ist.

Die Größe der Sklerotien hängt also nicht, wie J. Müller meinte, von der Entfernung der Blätter vom Erdboden ab, sondern von der Pilzart, von der Infektionszeit und von der während der Ausbildung herrschenden Witterung.

Recht verschieden erwies sich die Inkubationszeit der untersuchten *Rhytisma*-pilze. Sie läßt sich nicht immer genau angeben, weil man anfangs oft nicht genügend Sicherheit hat, ob die gelben Flecken auf den Blättern von einer *Rhytisma*-infektion herrühren oder nicht. Es wurde deshalb als Inkubationszeit die Zeit gerechnet, die von der Ansteckung bis zum Auftreten der ersten schwarzen Stellen auf der Blattoberseite (Beginn der Sklerotienbildung) verstreicht. Mitunter folgen diese schon wenige Tage nach dem Sichtbarwerden der ersten gelben Flecken, hier und da dauert es auch noch einige Wochen. Jedenfalls hängt die Inkubationszeit wesentlich von der Feuchtigkeit und Wärme ab, in der sich die Wirtspflanze befindet, weil dadurch auch das Gewebe beeinflusst wird. In den zarten Blättern der Treibhauspflanzen kann der Pilz sich viel rascher ausbreiten,

als im Gewebe der Freilandpflanzen, die dem Eindringen von Parasiten einen größeren Widerstand leisten.

Im Glashause betrug die Inkubationszeit 4—6 Wochen¹⁾, im Freien je nach der Witterung bis 8 Wochen.

Diese Befunde stimmen überein mit den Beobachtungen von Istvánffi und Pálínkás²⁾ über die Inkubationszeit der *Plasmopara viticola* in Rebblättern. Auch hier spielt die Witterung eine hervorragende Rolle und veranlaßt noch größere Schwankungen in der Zeitspanne, die zwischen der Ansteckung der Rebblätter durch den genannten Pilz und dem Hervorbrechen der Konidienbüschel verstreicht, als wir es bei *Rhytisma* gesehen haben.

VI. Morphologie des Pilzes und biologische Einzelheiten.

Die Gattung *Rhytisma* von Fries 1822³⁾ begründet, umfaßt heutzutage nach Saccardo über 70 Arten. Von diesen kommen aber nur ganz wenige auf Ahornarten vor und nur diese sollen näher betrachtet werden. Es sind das:

1. *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fries, Syst. myc. Bd. II. p. 569.
2. *Rhytisma punctatum* (Pers.) Fries Syst. myc. Bd. II. p. 569.
3. *Rhytisma aceris eriocarpae* Schw. Syn. Amer. bor. No. 2032.

Schon im vorigen Abschnitt ist eine weitere *Rhytisma*-Art genannt, die nur Bergahornblätter befällt: *Rh. pseudoplatani*.

Im folgenden ist die Morphologie dieser *Rhytisma*-Pilze näher behandelt. Hierbei konnten zahlreiche Ergänzungen und Richtigstellungen des bisher Bekannten gemacht werden. *Rh. aceris eriocarpae* lasse ich unberücksichtigt, da mir hiervon kein Material zur Untersuchung zur Verfügung stand. Nach Saccardo⁴⁾ ist es aber wahrscheinlich nur eine Form von *Rh. acerinum*, eine Vermutung, die durch Impfversuche bekräftigt werden könnte.

a) Sklerotien.

Die *Rhytisma*-Pilze überwintern in den abgefallenen Blättern im sog. Sklerotienzustande. Mit Beginn des Frühjahres werden die pechschwarzen Sklerotien dicker und auf ihrer Oberseite wird die Runzelung ausgeprägter (vgl. Tafel III, Fig. 5 u. 6 und Taf. IV, Fig. 1 u. 2), oft ist zu dieser Zeit der ganze übrige Teil des Blattes mit Ausnahme der Rippen verwest. Hand in Hand mit der Entwicklung der Sklerotien geht das Wachstum der Asci und Paraphysen, die unter der Sklerotienschicht angelegt sind. Bis Ende Februar erkennt man an Querschnitten durch die Sklerotien nur gleichartige, parallel nebeneinandergestellte, pfahlartige Zellen, genau ebenso, wie im Herbst oder Winter. Kurze Zeit darauf ist das Querschnittsbild aber bedeutend verschieden, denn Mitte März (in einer Seehöhe von 100—300 m, weiter oben entsprechend etwas später) läßt sich bei *Rh. acerinum* und *Rh. pseudoplatani* die Sonderung zwischen Asci und Paraphysen deutlich erkennen

¹⁾ Müller, J., gibt l. c. p. 8 an, daß von der Infektion bis zum Erscheinen der gelben Flecken 2—3 Wochen vergingen, und nach v. Tubeuf l. c. sind nur 3 Wochen nötig. Aus diesen Angaben ist aber nicht zu entnehmen, ob es sich um Infektionsversuche handelt, die allein sichere Zahlen liefern können.

²⁾ Istvánffi und Pálínkás, Infektionsversuche mit *Peronospora*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. p. 551.)

³⁾ Fries, System mycolog. Bd. II. p. 565.

⁴⁾ Saccardo, Sylloge Fungorum. Vol. VIII. p. 759.

und gegen Ende April bis Anfang Mai sind die Sklerotien ausgebildet. Man findet auf dem Scheitel der unregelmäßig verlaufenden Runzeln lochförmige oder meist linienförmige, oft etwas gewinkelte 1 mm breite Risse, zwischen denen die hellbraune oder graue Ascusschicht nebst den Paraphysen hervorschaut.

Nur selten und nur bei starkem Befall und feuchter Witterung findet man die pechschwarzen Sklerotien auch auf den Blattstielen auftreten, wie es J. Müller von seiner *Discomycopsis rhytismoides* beschrieben hat, die jedoch nach neuen Untersuchungen v. Höhnels¹⁾ nichts anderes als ein steriles *Rhytisma*-Stroma darstellt, das nachträglich, als das Gewebe schon am Absterben war, von einem saprophytischen Pilze bewohnt wurde, der die großen von J. Müller²⁾ abgebildeten Sporen erzeugte. Demnach ist die Gattung *Discomycopsis* als Synonym zu *Rhytisma* zu stellen.

Kurz vor der Reife der Sklerotien sieht man an Mikrotomschnitten die verschieden dicken, reich gegliederten und wirr verschlungenen Pilzhyphen zwischen den Zellen sowohl im Mesophyll des Blattgewebes, wie in der Palisadenschicht und in den Zellen der unteren Epidermis, nicht dagegen in den Zellen der oberen Epidermis und nur ausnahmsweise in den Zellen der Blattnerven, wo keine Stärke vorhanden ist.

Schwarzes, pseudoparenchymatisches Sklerotiengewebe bildet sich sowohl auf der Blattunterseite, wie auf der Blattoberseite aus. Auf der Blattunterseite ist die Schicht jedoch nur sehr dünn, mitunter fehlt sie auch ganz, während sie auf der Blattoberseite stark heranwächst.

Das Gewebe mit den Asken und Paraphysen entwickelt sich zwischen den oberen Epidermiszellen und der Kutikula, die abgehoben wird und die Sklerotien überspannt, bis sie aufplatzen. Die feinen netzförmigen Leistchen, welche man auf den Sklerotien bei starker Vergrößerung sieht, finden sich also ebensowohl auf gesunden wie auf *Rhytisma*-kranken Blattstellen, da sie der Blattkutikula eigen sind.

Die Zeit der Sklerotienreife hängt davon ab, in welcher Meereshöhe die Blätter gesammelt werden. Je höher der Fundort liegt, desto später reifen sie, auch wenn alle in gleicher Weise überwintert werden. Z. B. reifen die ersten *Rh. acerinum*-Sklerotien von Freiburg (300 m) im Jahre 1910 Mitte April, die des Bergahorns von Hinterzarten (900 m) 10—14 Tage später und *Rh. Andromedae* bei ca. 1000 m in einem Hochmoor gesammelt, noch später.

Das ungleichzeitige Reifen der verschiedenen *Rhytisma*-Sklerotien geht in der Natur parallel mit der Entwicklung der Blätter. Die Sklerotienreife tritt in der Natur (bei Topfexemplaren ist es häufig nicht so) immer dann erst ein, wenn die Blätter, welche dem Pilz als Nahrung dienen, schon ein bestimmtes Entwicklungsstadium erreicht haben. Sind sie noch zu jung oder noch gar nicht entfaltet, dann würden die ausgeschleuderten Askosporen zugrunde gehen. Es ist also zwischen der Blattentwicklung und der Sklerotienreife eine für die Existenz des Pilzes nötige Anpassung vorhanden.

Da nun Spitzahorne der Ebene ihre Blätter eher entfalten als Bergahorne und *Salix*-Arten im Gebirge, oder als *Andromeda polifolia*, die auf kaltem Hochmoorboden gedeiht, wo sich die Vegetation

¹⁾ Höhnel, F. von, Beiträge zur Mykologie. III. *Discomycopsis rhytismoides*, J. Müll. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. I. 1912. p. 220—222.)

²⁾ Müller, J., Jahrb. f. wissenschaft. Botanik. Bd. 28. Taf. XXVII.

erst mit Beginn des Sommers zu entwickeln beginnt, erklärt sich hieraus die Notwendigkeit einer verschiedenen Sklerotienreife.

Es ist bekannt, daß die Teleutosporen mancher Rostpilze nur dann im Frühjahr auskeimen, wenn sie den Winter über im Freien, allen Witterungsverhältnissen ausgesetzt, zugebracht haben¹⁾. Zu den ersten Impfversuchen wurden darum auch die *Rhytisma*-Sklerotien im Freien in Töpfen auf dem Erdboden überwintert, um sie den natürlichen Verhältnissen nahezubringen. Ob das nötig war, sollten einige Versuche zeigen, die ich mit Sklerotien auf Spitzahornblättern im Winter 1910/1911 anstellte. Die Überwinterung der Sklerotien geschah in folgender Weise:

A. Die Blätter wurden auf Erde an eine schattige Stelle im Freien ausgelegt und mit einem grobmaschigen Tuch überdeckt.

B. Die Blätter kamen in ein Säckchen, das im Freien, aber gegen Regen geschützt, aufgehängt war.

C. Die Blätter kamen in ein Säckchen, das in einem den ganzen Winter über 15—20° C warmen, trockenen Raume aufgehängt wurde.

D. Die Blätter kamen in einen feuchten, geheizten Raum und wurden überdies noch häufig mit Wasser übergossen.

Die erste Untersuchung der Sklerotien der vier Gruppen erfolgte am 9. März und ergab folgendes: Nur bei A waren die Askusschläuche und die Paraphysen schon entwickelt. Bei D waren deutliche, bei C undeutliche Fäden zu erkennen, bei B waren auch solche parallele Fäden noch nicht zu sehen.

Am 21. März kamen dann die 4 Gruppen verschieden überwinteter Sklerotien an eine mäßig feuchte, schattige Stelle ins Freie, wo sie häufig begossen wurden.

Am 1. Mai war folgender Befund zu verzeichnen.

A. Sklerotien größtenteils überreif; Sporen größtenteils schon ausgeschleudert.

B. Sklerotien gerunzelt, aber noch nicht reif.

C. Sklerotien gerunzelt, aber noch nicht reif.

D. Ein Teil der Sklerotien schleudert die Sporen aus.

Am 15. Mai waren auch die Sklerotien der Gruppen B und C reif und schleuderten die Sporen aus.

Es ergibt sich also aus diesen Versuchen: Die Art der Überwinterung der Sklerotien ist für deren Ausreifen von geringer Bedeutung. Die im Freien und feucht überwinterten Sklerotien sind zwar zuerst entwickelt, die übrigen reifen aber 2—3 Wochen später ebenfalls aus, wenn sie im Frühjahr genügend Feuchtigkeit zur Verfügung haben.

Feuchtigkeit ist für das Ausreifen jedoch unbedingt nötig, denn Sklerotien, die im Frühjahr trockengehalten werden, verdorren, ohne Sporen zu entwickeln.

Wenn die Sklerotienreife eingetreten ist, hat man es in der Hand, die Sporenaussaat hervorzurufen oder zu unterdrücken. Legt man die Sklerotien in trockene Luft, so kann man beim Erschüttern oder bei leichtem Luftzug ein feines Staubwölkchen sich darüber erheben sehen, das aus ausgeschleuderten Sporen und Paraphysen gebildet wird. Ebenso erfolgt auch in der

¹⁾ Vgl. z. B. Klebahn, Die wirtswechselnden Rostpilze. Berlin 1904. p. 28ff.

Natur, durch den Wechsel zwischen Trockenheit und Feuchtigkeit, das Ausstoßen der Sporen.

Dieses Ausschleudern läßt sich an reifen Sklerotien unter dem Mikroskop verfolgen, am besten, wenn man einen Tropfen absoluten Alkohols auf ein Sklerotium setzt.

Die nicht benetzten Risse schleudern dann lebhaft die Sporen aus, indem sich die Ränder der Risse zusammenziehen, wodurch im Innern der Askusschicht ein starker Druck entsteht.

Die Kraft, mit der die Sporen ausgeschleudert werden, ist nicht groß; schon de Bary¹⁾ sagt, sie betrage nur wenige Millimeter. Es verdient das um so mehr hervorgehoben zu werden, weil man nach den Angaben zahlreicher neuer Autoren gerade das Gegenteil erwarten sollte²⁾. Die herausgepreßten Sporen werden darauf vom Luftzug erfaßt und man sieht dann mitunter kleine Staubwölkchen von Sporen sich bis 1 cm hoch über das Sklerotium erheben.

Legt man einen mit Glyzerin bestrichenen Objektträger 2 mm über ein reifes Sklerotium von *Rh. acerinum* oder *Rh. pseudoplatani*, so findet man daran nur selten eine Spore haften. Bei einem Abstand von nur 1 mm hat man dagegen in kurzer Zeit auf dem Objektträger eine Unmenge von Sporen, die sich zum Studium ihrer strittigen Morphologie gut eignen.

Die Schleuderkraft kommt offenbar dadurch zustande, daß sich beim Eintrocknen die Sklerotienlager zusammenziehen. Hierdurch werden die gequollenen Paraphysen fest an die dazwischenstehenden Askusschläuche gepreßt. Wenn die Spannung eine gewisse Grenze überschritten hat, dann öffnet sich der Askus am Scheitel und preßt die Sporen heraus, um dann zusammenzufallen.

Im allgemeinen mag das Auspressen momentan erfolgen, aber es gibt zahlreiche Ausnahmen, denn man sieht oft einen Askus, dessen Sporen halb herausgepreßt sind und halb noch im Askus stecken (vgl. Tafel IV, Fig. 6).

Liegen die Sklerotien längere Zeit feucht, so pressen sie die Sporen allmählich heraus. Man findet dann über den Spalten Ende April kleine, gelbgrüne bis zitronengelbe Tröpfchen einer schleimigen Flüssigkeit, welche mit Wasser eine milchige Trübung gibt. In diesen Tröpfchen liegen eine Unmenge Sporen und abgerissene Askusschläuche.

Wie der Askus sich öffnet, ist ebenfalls noch nicht genau bekannt. Nach J. Müller wirft er „die ganze obere Kappe“ ab. Verschiedentlich konnte ich ganz deutlich erkennen, daß der dünnwandige Askus in einem dickwandigen, zylindrischen, innen hohlen und am Ende durch ein dünnes Häutchen geschlossenen Zapfen ausläuft (Tafel IV, Fig. 5).

Bei der Sporenreife treten dann die Sporen durch den schmalen Zapfenkanal, sprengen die dünne Wand an dessen Ende und schlüpfen nacheinander oder wenigstens nicht alle gleichzeitig heraus. Das Loch dehnt sich

¹⁾ De Bary, Vergl. Morphol. u. Biolog. d. Pilze. p. 98.

²⁾ Derartige Angaben finden sich z. B. bei v. Tubeuf, Pflanzenkrankheiten, p. 156: „Diese (die Asci) ejakulieren die fädigen Sporen mit großer Gewalt nach ihrer Reife im Mai und Juni.“

Laubert, Die Schwarzfleckenkrankheit (*Rhytisma acerinum*) der Ahornbäume (Flugblatt 29 der Kaiserl. Biolog. Anst. f. Land- u. Forstwirtschaft.), wo es heißt: „Aus den Schläuchen werden dann die Sporen in kleinen Wölkchen mit großer Gewalt mehrere Zentimeter hoch in die Luft gespritzt.“

immer mehr und ist schließlich nach dem Austritt aller Sporen weit, so daß es den Anschein erwecken kann, es sei eine Kappe abgeworfen worden.

b) Askosporen.

Sowohl die Morphologie der Sporen, wie die Infektion durch sie war bisher nur lückenhaft bekannt und ferner zeigten sich in den Darstellungen verschiedener Autoren Widersprüche, die aufgeklärt werden mußten.

Die genauesten Angaben über die Askosporen verdanken wir Klebahn¹⁾, welcher zuerst eine Gallerthülle um die Sporen erkannte. Diese Beobachtung ist aber von J. Müller „als durchaus den Tatsachen entbehrend“ bezeichnet worden. Manche Autoren gaben an, die Sporen seien durch Querwände geteilt, andere sahen nur ungeteilte Sporen.

Die Sporen liegen parallel nebeneinander im Askus (vgl. Tafel IV, Fig. 3), sie sind sehr langgestreckt und erscheinen fadenförmig. Das sind sie aber in Wirklichkeit nicht, denn sie werden von einer wasserhellen, darum schwer sichtbaren Gallerthülle umgeben (vgl. Tafel II, Fig. 4 und Tafel IV, Fig. 7). Die 8 Sporen füllen den Innenraum des Schlauches nahezu völlig aus. Die kleinen Hohlräume, welche sie noch frei lassen, sind mit einer wässerigen Flüssigkeit erfüllt. Gewöhnlich zeigen die Sporen eine leichte Krümmung, am oberen Ende sind sie abgerundet, am untern zugespitzt.

Die Sporenwand läßt zwei Schichten erkennen, eine innere, sehr dünne, aber stark lichtbrechende und darum leicht sichtbare und eine äußere, gallertige die $\frac{3}{4}$ so dick ist als der Innenraum der Spore. Diese gallertige Exine ist am oberen Ende der Spore kopfartig angeschwollen und hier viel dicker. Gegen das untere Sporende nimmt die Exine an Dicke ab (vgl. Tafel IV, Fig. 7).

Mit guten Mikroskopen ist die farblose Exine auch ohne Färbung zu erkennen und ebenso tritt sie auf einer Mikrophotographie ungefärbt hervor (Taf. II, Fig. 4). Sonst erhielt ich deutliche Bilder durch Färben mit Methylviolett. Der Sporenhalt wird dann fast schwarz und die Exine ganz schwach gefärbt, so daß sie sich bei richtiger Beleuchtung vom Untergrund gut abhebt. Auch andere Färbemittel führen zum Ziele.

Diese Gallerthülle ist also unzweifelhaft vorhanden und J. Müller hat sie offenbar nur übersehen. De Bary hat sie zuerst bei *Rh. andromedae* beobachtet²⁾.

Alle Sporen der *Rhytisma*-Arten auf Ahornblättern, die ich untersuchte, waren zur Zeit der Ejakulation stets einzellig und zeigten keine Spur von Querwänden, während v. Tubeuf³⁾ u. a. solche angeben. Auch in späteren Stadien, nämlich bei der Keimung, sind keine Querwände nachgewiesen. Die hackenförmig gebogenen Paraphysen, die mit den Sporen gleichzeitig ausgestoßen werden, haben dagegen zahlreiche Querwände, so daß vielleicht eine Verwechslung mit diesen vorliegt, die allerdings leicht zu vermeiden ist, wenn man auf die Gallerthülle achtet, die nur den Sporen zukommt.

Auch die Größenangaben der Sporen schwanken bei den Autoren beträchtlich, besonders die Dicke der Spore ist falsch angegeben, weil man die Gallerthülle stets übersehen hatte. Sowohl die Länge, wie die Dicke der

¹⁾ Klebahn, H., Beobachtungen über die Sporenentleerung des Ahornrunzelschorfs *Rhytisma acerinum* Fr. („Hedwigia“. 1888. p. 305—306.) und Bemerkungen über *Rhytisma acerinum* und über die Arbeit des Herrn Dr. J. Müller über die Runzelschorfe. (Bot. Centralbl. 1894. No. 23.)

²⁾ De Bary, Vergl. Morphologie u. Biologie d. Pilze. p. 110.

³⁾ v. Tubeuf, Pflanzenkrankheiten, p. 256.

Sporen ändert sich, wie schon J. Müller nachgewiesen hat, je nach der Ausbildung des Sklerotiums. Meine Messungen ergaben bei *Rh. pseudo-platani* im Durchschnitt 74 μ Länge und 5—6 μ Dicke (samt Gallert-hülle; ohne diese 3 μ dick). Die größte Länge 85 μ , die kleinste 54 μ .

Bei überreifen Askusschläuchen beobachtet man häufig, daß die darin befindlichen Sporen in der Längsachse um sich spiralig gedreht sind, besonders an ihrem oberen Ende (vgl. Taf. IV, Fig. 4). Eine derartige Drehung ist aber nur dann zu sehen, wenn die Sporen infolge zu starken Wachstums prall dem Schlauche anliegen. Wenn nun das Loch im Scheitel des Askus sich nicht bald öffnet, werden die Sporen unter dem Druck tortiert. Die Torsion schwindet nämlich sofort, wenn der Scheitel platzt.

Wie die Sporen auf die jungen Ahornblätter gelangen, wo sie neue Infektionen veranlassen, hat ebenfalls Klebahn¹⁾ zuerst und m. E. befriedigend beantwortet. Da die Schleuderkraft, wie wir gehört haben, nur sehr gering ist, können die Sporen nicht dadurch eine Infektion bewirken, daß sie bis auf die Blätter geschleudert werden. Nach Klebahn werden sie nach der Ejakulation von jedem Windhauch erfaßt, emporgewirbelt und vermögen sich dann mittels der Gallerthülle an den Blättern festzusetzen. Es braucht aber nicht einmal ein schwacher Luftzug zu gehen, um die Sporen mitzuführen. Es genügen schon die Strömungen, die immer zwischen dem Erdboden und den darüber befindlichen Luftschichten vorhanden sind, um die überaus kleinen Askosporen mitzunehmen. Je näher die Blätter dem Erdboden stehen, desto dichter ist der Sporenschwarm, der sie treffen kann, während er sich nach oben rasch zerstreut, so daß dann auch nur noch spärliche Infektionen zustandekommen können.

J. Müller tritt der Ansicht Klebahns über das Zustandekommen der Infektionen entgegen, weil er die Gallerthülle an den Sporen nicht beobachten konnte. Da diese aber sicher vorhanden ist, fehlen Gründe, um sich der Klebahnschen Ansicht entgegenzustellen.

Nicht unmöglich ist es, daß ab und zu auch durch Insekten Sporen übertragen werden, aber die Regel scheint das nicht zu sein.

c) Spermation.

Eine stattgefundene Infektion läßt sich zuerst an den gelben Flecken auf den Blättern erkennen, die durch das Wachstum des Pilzes im Blattinnern erzeugt werden. Nach und nach erscheinen auf den gelben Flecken von Juni ab bis August schwarze, warzenförmige Erhebungen (vgl. Abb. 4), die häufig in konzentrischen Ringen angeordnet sind. Unter diesen schwarzen Punkten findet sich eine weiße, schleimige Schicht, die eine ungeheure Menge Spermation enthält. Diese werden durch einen Riß in der Mitte der schwarzen Flecken in Form von milchigen, schleimförmigen Tröpfchen von Juli bis September herausgepreßt.

Die Spermation, die man früher für die Konidien eines besonderen Pilzes hielt, wurden zuerst vom Bergahorn beschrieben²⁾ (*Melasmia acerina* Lév.), (*M. punctata* Lév.). Sie sind bei allen Ahorn-*Rhytisma*-Arten annähernd gleich, stäbchenförmig, 5—6 μ lang und etwa 1 μ dick, stark

¹⁾ Klebahn, Beobachtung über die Sporenentleerung des Ahornrunzelschorfes. („Hedwigia“. 1888. p. 305.)

²⁾ Lévêillé, J. H., Descriptions des champignons de l'Herbier du Muséum de Paris. (Ann. scienc. nat. Sér. III. T. 5. 1846. p. 276.)

lichtbrechend, an einem Ende oft etwas keulenförmig verdickt (vgl. Taf. IV, Fig. 8).

Über den Zweck der Spermarien ist man noch völlig im unklaren, weil man die Entwicklungsgeschichte der *Rhytisma*-Pilze noch nicht bis in die Einzelheiten feststellen konnte. Die Hyphen bilden nämlich ein so dichtes und verworrenes Geflecht, daß man unter dem Mikroskop eine bestimmte Hyphe nicht weit verfolgen kann. Manche halten die Spermarien für funktionslos gewordene männliche Sexualzellen, aber Beweise fehlen für diese Annahme. Zum Keimen sind die Spermarien meines Wissens bis jetzt noch nicht gebracht worden.

VII. Schädlichkeit der Pilze.

Eine Schädigung der Ahorne durch den *Rhytisma*-Pilz in dem Maße, daß sich eine Bekämpfung lohnte (Einsammeln und Verbrennen oder Untergraben des befallenen Laubes im Herbst) konnte ich nirgends feststellen.

Von manchen wird als Grund der Bekämpfung der Krankheit das unschöne Aussehen der mit schwarzen Flecken bedeckten Blätter angeführt, doch scheint mir dieser Grund Geschmackssache zu sein.

Ich möchte hier nur ein Beispiel anführen, das zeigen soll, wie unschädlich der Pilz praktisch ist, selbst wenn er in ungeheurer Menge am Laub auftritt und infolgedessen die Assimilation des Blattes frühzeitig stört.

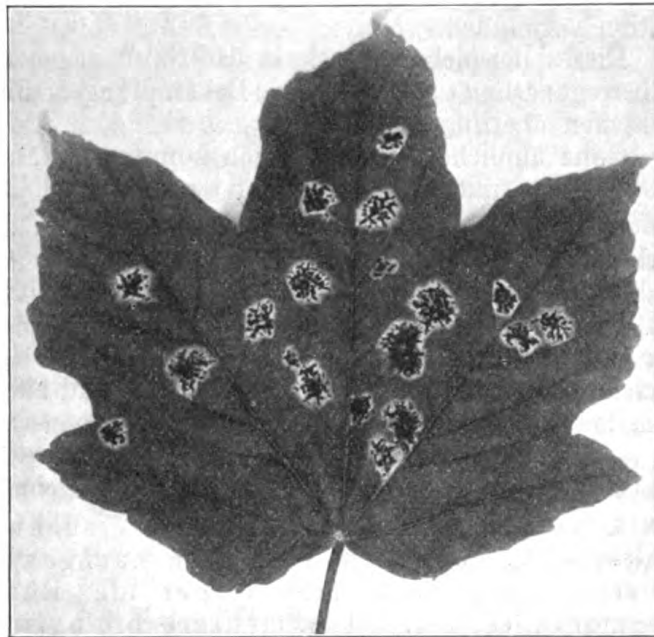


Fig. 4. Bergahornblatt von *Rhytisma pseudoplatani* befallen. Spermarienbildung.

Bei Durlach befindet sich, wie ich schon früher erwähnt habe, eine Gruppe von Bergahornbäumen, die im Jahre 1908 schon im Juli ihr Laub fallen ließen, wegen zu starken Befalles durch *Rh. pseudoplatani*. Im August standen die Bäume kahl inmitten der übrigen noch grünen Bäume, unter denen sich auch ein Spitzahorn befand. Die naheliegende Annahme, die Bergahorne wären durch den frühzeitigen Laubfall überaus stark geschädigt worden, traf nicht zu, denn im Jahre 1909 wuchsen sie ganz üppig und entfalteten viele Blätter. Man hätte glauben können, der frühe Blattfall und der damit zusammenhängende frühzeitige Nahrungsabschluß müßte sich in einer verschiedenen Jahrringbreite zu erkennen geben. In dieser Richtung im Jahre 1912 angestellte Untersuchungen erbrachten aber hierfür keine Belege, denn alle untersuchten Äste zeigten nur

geringe Schwankungen in dem jährlichen Holzzuwachs. Eine erhebliche Schädigung fügt der Pilz dem Baume also nicht zu.

Das Jahr 1909 war für die Entwicklung parasitischer Pilze ungünstig. Diese Tatsache, die sich bei den Infektionsversuchen schon herausstellte, war aber noch viel schöner erkennbar an den genannten Bergahornen. Im Juli konnte auch nicht eine Spur des *Rhytisma*-Pilzes entdeckt werden. Erst Ende August fanden sich an einigen der untersten Blätter je 1—4 ziemlich kleine, schwarze Flecken, die ohne jeden Nachteil für den Baum waren. Sie erreichten auch bis zum Herbst nicht die normale Größe.

Das überreiche Auftreten des *Rhytisma*-Pilzes hatte also den Erfolg, daß die Sklerotien nicht ausreifen und daß infolgedessen im kommenden Jahre die Infektion nur äußerst schwach sein konnte, zumal das Jahr 1909 auch zur Zeit der Sporenausschleuderung verhältnismäßig trocken war und dadurch ebenfalls das Auftreten der *Rhytisma*-Flecke ungünstig beeinflusste. Auch im Jahr 1910 traf man, wie nach dem Befund im Herbst 1909 zu schließen war, an der genannten Stelle nur eine äußerst schwache Infektion vorhanden.

Dieses Beispiel zeigt, wie in der Natur gegen manche Krankheiten eine Selbstregulierung auftritt, die Bekämpfungsmaßnahmen von seiten der Menschen überflüssig macht.

Ganz ähnliche Beobachtungen konnten z. B. auch an *Cronartium ribicola* und an *Gloeosporium ribis* gemacht werden.

Beide Pilze traten 1909 am Beerenobst in einzelnen Teilen Badens so verheerend auf, daß die schwarzen Johannisbeeren keine Früchte ansetzten und daß die roten Johannisbeeren im Juli völlig blattlos dastanden. Im Jahr 1910 waren dagegen an den am stärksten befallenen Stellen die Krankheiten nur ganz wenig zu beobachten, so daß sie für die Kultur keinerlei Bedeutung hatten. Auch hier scheinen die Witterung und andere nicht näher studierte Umstände, die damit zusammenhängen, den Anschlag gegeben zu haben.

VIII. Wichtigste Ergebnisse.

1. Durch die vorstehenden Untersuchungen wurde die Spezialisierung bei einem Parasiten nachgewiesen, der seither als plurivor galt. Was man bisher als *Rhytisma acerinum* zusammenfaßte, zerfällt in mehrere biologische Rassen:

a) Der Pilz auf Spitzahornblättern befällt vor allem Spitzahorn, weniger stark Bergahorn und Feldahorn (= *Rh. acerinum* fo. *platanoides*).

b) Auf Bergahorn kommen zwei biologisch deutlich verschiedene *Rhytisma*-Arten vor, die sich morphologisch nur unscharf unterscheiden: *Rh. acerinum* fo. *platanoides* und *Rh. pseudoplatani* nov. spec.

c) Auf Feldahorn kommen allem Anscheine nach auch zwei Rassen vor. Die Sonderung ist aber nicht so scharf, daß man von Arten sprechen könnte. Der eine Pilz stellt das gewöhnliche *Rh. acerinum* fo. *platanoides* dar, das auch noch auf Spitzahorn und Bergahorn vorkommt, der andere lebt vornehmlich auf Feldahorn, befällt aber auch schwach den Spitzahorn, nicht aber den Bergahorn (= *Rh. acerinum* fo. spec. *campestris* n. fo.).

2. Die angegebene Spezialisierung wurde auf Grund von

Beobachtungen im Freien, von Impfversuchen an Pflanzen im Freien und an solchen unter Glaskästen erkannt.

3. Auch auf fremdländischen Ahornarten sind *Rhytisma*-Pilze bekannt, die allem Anscheine nach spezialisierte Formen oder Arten darstellen, aber experimentell daraufhin noch nicht geprüft sind.

4. Die Ansteckung der Ahornblätter durch die verschiedenen *Rhytisma*-Pilze erfolgt fast ausnahmslos von der Unterseite aus, wosich Spaltöffnungen in großer Zahl vorfinden. Von der Blattoberseite aus findet nur dann eine Infektion statt, wenn die Epidermis verletzt ist (durch Aufdrücken reifer Sklerotien auf junge Blätter).

5. Zwischen der Stärke des Befalls der Ahornblätter durch *Rhytisma*-Pilze und der zur Zeit der Sporenaussaat gefallenen Niederschläge bestehen gleichlaufende Beziehungen. Bei reichen Niederschlägen Ende April und Anfang Mai ist ein starker Befall zu verzeichnen und umgekehrt.

6. Die Inkubationszeit der *Rhytisma*-Pilze ist starken Schwankungen unterworfen, je nach der Luftfeuchtigkeit und Wärme. Bei in Glaskästen wachsenden Pflanzen beträgt sie vier Wochen, im Freien 8 Wochen und noch länger.

7. Die Reife der Sklerotien erfolgt im Frühjahr um so später, einem je höheren Fundort sie entnommen sind, auch wenn alle in gleicher Meereshöhe überwintert wurden.

8. Von geringer Bedeutung ist die Art der Überwinterung (trocken, feucht, im Freien, im geheizten Raum) der Sklerotien. Die im Freien und feucht überwinterten reifen zwar zuerst, die übrigen 2—3 Wochen später ebenfalls, vorausgesetzt, daß ihnen im Frühjahr genügend Feuchtigkeit zur Verfügung steht.

9. Die reifen Sporen werden nur etwa 1 mm hoch emporgeschleudert und dann durch den Luftzug weiter emporgehoben. Die Gestalt der Sporen wurde von den Autoren meist ungenau geschildert. Die Sporen besitzen eine Gallerthülle und sind einzellig.

10. Das Ausschleudern der Sporen erfolgt durch Quellungsdruck im Askus. Das Askusende ist zylindrisch, dickwandig, innen hohl und nur am Ende mit einer dünnen Wand versehen, die durchgestoßen wird.

11. Einen dauernden Schaden können die *Rhytisma*-Pilze den Ahornbäumen nicht zufügen, da in der Natur eine Selbstregulierung in der Stärke des Befalls eintritt.

Tafelerklärung.

Tafel I.

Fig. 1. *Rhytisma pseudoplatani* bewirkt, daß Mitte Juli die Blätter vom Baume abfallen. Links ein stark befallenes Blatt, das aber noch am Baume hängen blieb, rechts ein Blatt von der Gipfelpartie des Baumes. Trotz des starken Befalls hat der Ahornbaum keine nennenswerte Beschädigung erlitten. Photogr. Mitte Juli 1908.

Fig. 2. In der Natur aufgenommene Gruppe von Spitz- und Bergahornbäumchen. Nur die Bergahornblätter sind von *Rhytisma* befallen (*Rh. pseudoplatani*). Aus dem Rittnertwald bei Durlach. Photogr. August 1909.

Tafel II.

Fig. 3. Links ein Spitzahornblatt mit *Rh. acerinum*, rechts ein Bergahornblatt mit *Rh. pseudoplatani*. Von der Waldseestraße bei Freiburg. Photogr. September 1909.

Fig. 4. Sporen von *Rhytisma pseudoplatani* mit Jodjodkalium gefärbt. Vergr. ca. 270 : 1. Photogr. April 1909.

Tafel III.

Fig. 5. Reife Sklerotien von *Rh. acerinum* auf einem Spitzahornblatt nat. Größe. Photogr. 30. April 1912.

Fig. 6. Reife Sklerotien von *Rh. pseudoplatani* auf Bergahornblatt, nat. Größe. Photogr. 8. Mai 1912.

Tafel IV.

Fig. 1. Sklerotien von *Rhytisma acerinum* auf Spitzahornblatt. Vergr. 2,5 : 1.

Fig. 2. Sklerotien von *Rh. pseudoplatani* auf Bergahornblatt. Vergr. 2,5 : 1.

Fig. 3. Askusschläuche mit Sporen und Paraphysen. Vergr. 1000 : 1.

Fig. 4. Einzelner Askus mit gedrehten Sporen. Vergr. 1200 : 1.

Fig. 5. Oberer Teil eines Askus mit der zylindrischen Mündung, durch welche die Sporen gepreßt werden. Vergr. 1200 : 1.

Fig. 6. Oberer Teil eines Askus mit austretenden Sporen. Vergr. 1200 : 1.

Fig. 7. Einzelne Spore. Vergr. 1200 : 1.

Fig. 8. Spermatien. Vergr. 2000 : 1.

Nachdruck verboten.

Die einheimischen Kohlerdföhe.

Eine kritische Darstellung der in Mitteleuropa an gebauten Cruciferen
schädlichen Halticinenarten.

Von Franz Heikertinger, Wien.

Mit 18 Figuren.

Wohl jedem, der je den Erdflöhe ein — wenn auch nur vorübergehendes — Interesse entgegengebracht und in irgendeinem Werke über sie nachgeschlagen hat, wird der Name der *Haltica oleracea*, des „Kohlerdflohs“ schlechthin, als der Name des Repräsentanten, des Hauptschuldigen der ganzen Sippe, im Gedächtnisse geblieben sein.

Der Name eines gänzlich Unschuldigen.

An anderer Stelle habe ich bereits in Wort¹⁾ und Schrift²⁾ auf diesen selt-

¹⁾ Über Lebensweise, Standpflanzen und Schädlichkeit der einheimischen Erdflöhe. (Vortrag in d. Sitzung d. Coleopterolog. Sekt. d. k. k. zool.-bot. Gesellsch. in Wien, am 19. Januar 1911.)

²⁾ Die Sage vom Kohlerdfloh. (Verh. d. zool.-bot. Gesellsch. Wien 1912. Bd. 62. p. 69—81.) — Um etwaigen Mißdeutungen der in diesem kürzlich erschienenen Artikel ausgesprochenen Ansichten zu begegnen, seien mir einige Worte zur Sache gestattet. An erster Stelle muß ich ausdrücklich feststellen, daß es mir ferne lag, mit meinen vielleicht etwas schroff gehaltenen Ausführungen eine einzelne Person treffen zu wollen. Ich wollte nichts anderes, als einen jahrhundertalten Fehler an einem der ältesten und einem der neuesten Werke, die ich wahllos herausgriff, demonstrieren. Ich bedaure, wenn ich vielleicht in regem Eifer meine Worte in einer Weise gewählt habe, die geeignet sein könnte, eine persönliche Spitze vorzutäuschen, und fühle mich aus freien Stücken veranlaßt, dem dortselbst — gleichsam als Personifikation der heutigen Phytopathologie hinsichtlich der Halticinen — im Detail kritisierten Werke nunmehr als Ganzem Gerechtigkeit widerfahren zu lassen.

Und es ist mir eine Freude, mich in dieser Hinsicht voll dem Urteile bewährter Fachmänner anschließen zu müssen, die das in Rede stehende Werk — V. Ferrant,

samen, jahrhundertalten Irrtum hingewiesen und auch der vorliegende Artikel entspringt dem Bestreben, den weitesten Interessentenkreisen ein klares Bild der cruciferenschädlichen Erdflöharten zu vermitteln. Speziell an den Praktiker, an den Landwirtschafts-Entomologen, an den Phytopathologen möchte ich mich hier wenden. Eingedenk dieses Zwecks habe ich daher der morphologisch-systematischen Seite des Gegenstandes nur eine andeutungsweise, vorwiegend auf die angefügten Bestimmungstabellen beschränkte Behandlung gewidmet und der historischen Seite (der Kritik der einschlägigen Literatur) überhaupt keinen Raum gegönnt. Lediglich praktisch Verwertbares soll zur kurzgefaßten Darstellung kommen, und als Grundlage hierfür sollen jahrelange, auf streng coleopteren-systematischer Basis angestellte kritische Beobachtungen und Versuche dienen.

Mit Rücksicht auf die beabsichtigte Verwendungsmöglichkeit dieser Arbeit auch für den entomologischen Laien mag es daher entschuldigt werden, wenn die nachfolgenden Ausführungen und Tabellen in einem Tone gehalten sind, den der Fachmann als wenig wissenschaftlich empfinden wird, und wenn sich Erläuterungen und Vermerke eingeflochten finden, die ihm als störende, unwissenschaftliche Überflüssigkeiten erscheinen. Ihm diene die Versicherung, daß die wissenschaftliche Zuverlässigkeit des Vorgebrachten hierdurch keine Einbuße erlitten hat.

Der Kürze und Übersichtlichkeit halber gliedere ich das folgende in drei Abschnitte:

Der erste bespricht die tatsächlich kohlschädlichen Erdflöh-Gattungen und -Arten.

Der zweite gibt eine Übersicht der hauptsächlich geschädigten Pflanzen.

Der dritte spricht von den ungerecht als Kohlschädlinge gebrandmarkten Erdflöhen und deren wirklichen Standpflanzen.

Als vierten Teil schließe ich eine nach Möglichkeit praktischen Bedürfnissen angepaßte Bestimmungstabelle über sämtliche als Cruciferenbewohner bekannte Erdflöharten Mitteleuropas an.

Die schädlichen Insekten der Land- und Forstwirtschaft, ihre Lebensweise und Bekämpfung, Luxemburg 1911 — als eines der besten, zuverlässigsten und praktisch brauchbarsten der neuesten Schädlingsliteratur bezeichnen. Gewiß wird es seinem Zwecke, ein praktisches Handbuch für Ackerbaubetreibende, Gärtner und Forstwirte zu sein, voll und ganz gerecht werden.

Seine von mir erwähnten Fehler sind lediglich die Fehler der heutigen Phytopathologie im allgemeinen, die Fehler einer Zeitperiode, der sich der Einzelne nicht entwinden kann und die keinem Einzelnen zum Vorwurfe gemacht werden können, die jedem Werke dieser Art anhaften müssen, denn es bedarf keines Wortes darüber, daß der Autor eines derart vielseitigen Buches sich vertrauend auf die Literatur seiner Zeit stützen muß, daß er nicht imstande ist, auch nur einen größeren Teil der aufgenommenen Angaben nachzuprüfen, und daß er nie und nimmer dazu verpflichtet werden kann, dort Neues zu finden, wo eine Reihe von Detailkennern ein Jahrhundert lang achtlos vorbeigeschritten ist.

Es drängt mich, dies klar auszusprechen und damit Herrn Ferrant und seinem verdienstvollen Werke gerecht zu werden. Über den Stand der Schädlingkunde von heute, die als Zweig der „Phytopathologie“ allmählich zu einer Disziplin der Botanik geworden ist, die für entomologische Forderungen vielfach wohl doch nicht immer das genügende Interesse aufzubringen vermag, möchte ich an anderem Orte einige Worte verlieren.

I. Die tatsächlich kohlschädlichen Erdflöharten und die Art ihrer Schädlichkeit.

Seit der Zeit, da der Gattungsname „*Haltica*“ noch der Inbegriff aller Erdflöhe war, hat sich in systematischer Hinsicht vieles geändert. Die Erdflöhe Mitteleuropas sind in 25 Gattungen aufgespalten worden. Die Literatur der Landwirtschaftsschädlinge aber hat dem nur widerstrebend und unzulänglich Rechnung getragen. Wohl finden wir die Namen *Psylliodes*, *Phyllotreta*, *Crepidodera* u. a. vielfach auch in solchen Werken aufgeführt; an erster Stelle aber paradiert nach wie vor „*Haltica*“ mit der ominösen „*oleracea*“, die von allen erdenklichen Pflanzen — auch von solchen, auf denen überhaupt kein Erdfloh lebt — angegeben wird. Es sei daher in erster Linie klar ausgesprochen:

Die den Gegenstand dieser Abhandlung bildenden wirklich kohlschädlichen Erdflöhe gehören nur zwei Gattungen an: *Phyllotreta* Küst. und *Psylliodes* Latr. Für keine dieser Gattungen darf der Gattungsname *Haltica* in Gebrauch genommen werden, da dieser Name heute einer entfernt stehenden, gut begründeten anderen Gattung zukommt, die mit den vorangeführten Gattungen nichts zu tun hat und unter keiner Bedingung mit ihnen zusammengeworfen werden darf. Keine einzige Art der Gattung *Haltica* im heutigen Sinne ist ein Kohlschädling oder überhaupt ein Cruciferenbewohner.

Dies vorausgesandt.

1. Gattung: *Phyllotreta* Foudr.

Diese Gattung allein umfaßt dasjenige, was Gärtner und Landwirt unter „*Kohlerdflöhe*“ verstehen, so vollständig, daß wir alles übrige ruhig ausschalten könnten. Gegen die hortikulturelle Bedeutung und die Popularität der *Phyllotreten* treten alle übrigen *Halticinen* weit in den Hintergrund.

Die *Phyllotreten*¹⁾ sind *Halticinen* von Flohgröße oder wenig darüber (1,5—2,5 mm), ziemlich flach (niedergedrückt) gebaut, entweder einfarbig dunkel (schwarz, dunkel blaugrün oder metallgrün) oder schwarz mit einer gelben Längsbinde (die zuweilen in 2 Flecke geteilt ist) auf jeder Flügeldecke. Die Fühler sind 11gliedrig, der Halsschild trägt niemals eine Querrfurche und niemals ein Längsfältchen, die Tarsen der Hinterbeine sind am Ende der Schiene angesetzt. (Bezüglich des Näheren vgl. die am Schlusse angefügten Bestimmungstabellen und die Figuren 4—12.)

Die Hauptschädlichkeit dieser Tiere fällt in den ersten Frühling und betrifft die ausgebildeten Käfer; die Larven der *Phyllotreten* sind fast durchwegs noch unbekannt. Die Hauptursache der Schädlichkeit dieser Gattung liegt in dem Umstande, daß bei ihr der fertige Käfer, die Imago, überwintert, und daß ihr Angriff Pflanzen gilt, die im Frühjahr gesät, dem Befall in ihren ersten Jugendstadien standhalten müssen. Die menschlichen Behausungen und ihre Nebenobjekte bieten dem Tiere hierzu vielfach mehr und bessere Winterverstecke als das Freiland. Die erste warme Märzsonne weckt es und es geht auf Nahrung aus, die ihm in den aufkeimenden Pflänzchen der wilden und kultivierten Cruci-

¹⁾ Der Name „*Phyllotreta*“ — die Blattdurchbohrende — ist treffend gewählt für die Gattung.

feren reichlich geboten wird. Die winzigen Pflänzchen werden entweder fast völlig abgefressen, oder an den Cotyledonen oder am Stengel derart schwer beschädigt, daß sie bald eingehen. Bei entsprechend großer Käferzahl ist die oft völlige Vernichtung der Saat eines Beetes ein Werk von Stunden oder Tagen.

Dies ist der charakteristische, dem Landwirt und Gartenbesitzer wohl-bekannte Erdflöhschaden. Die Tätigkeit der auf anderen Pflanzenfamilien heimischen Halticinenarten tritt zurück vor ihm, und auch der Sommer- und Herbstfraß der Phyllotreten selbst ist von relativ geringem Belange dagegen. Denn die Pflanze, die bereits eine gewisse Höhe erreicht hat, widersteht dem Fraß der Tiere leicht ohne direkte Gefahr für ihr Leben. Allerdings kann das Befressen von Blattgemüse, wenn es in ausgedehnterem Maße erfolgt, den Marktwert der Produkte wesentlich beeinträchtigen.

Was das Fraßbild der Phyllotreten anbelangt, so ist das sichere Erkennen desselben für die Praxis nicht ohne Bedeutung. Es frißt ja neben ihnen noch manches im Garten und der flüchtige Beobachter ist vielfach geneigt, die verschiedensten Fraßbilder auf ein gerade in Anzahl vorhandenes Tier zu beziehen.

Beim Fraße der Halticinen ist in erster Linie zu beachten, daß kein Erdfloh ein Blatt vom Rande her befrißt, es sei denn, daß ihn dessen allzu-geringe Größe hierzu veranlaßt, was bei kleineren Cotyledonen vielfach der Fall ist. In entwickelte Blätter frißt die *Phyllotreta* kleine, unregel-mäßig rundliche Weideplätzchen, die einzeln selten größer sind als der Käfer, bei reichlicherem Fraß indessen zu größeren Flecken oder Löchern zusammen-fließen. Dünnere Blätter, wie sie etwa Rübe und Rettig haben, werden zu-meist in Form richtiger Löcher glatt durchbrochen. Bei dickeren Blättern jedoch, wie sie etwa den Kohlarten eigen sind, wird lediglich die Epidermis einer Blattseite durchbrochen, das Mesophyll verzehrt, das Blatthäutchen der Gegenseite jedoch ganz oder teilweise in Gestalt eines transparenten „Fenster-chens“ intakt belassen. Bei kleinen Blättern alteriert der Fraß oft Haupt-rippen und bedingt hierdurch asymmetrische Verkümmierungen des Blattes. Bei großen Blättern ist er zumeist gehäuft in den äußeren Teilen, oft sieb-artig aus eng stehenden kleinen Plätzchen gebildet. Die Folge kann ein partielles Vertrocknen und Einreißen der Außenteile des Blattes sein. Kahl-fraß bei großen Blättern kann niemals durch Erdflöhe verschuldet sein, son-der ist stets anderen, größeren Tieren, wie Raupen, Schnecken u. dgl. zuzu-schreiben. Der Erdflohfraß — soweit er von den Imagines herrührt — ver-schont auch die größten Blätter nicht — (es wird vielfach irrig angegeben, daß nur Blätter im Jugendalter angenommen werden) — aber er bedroht das Leben einer entwickelten Pflanze nicht mehr. Getötet werden lediglich die jungen Keimpflänzchen der Aussaat.

Der Schaden geschieht fast nie durch eine Art allein. Zumeist sind zwei, drei, vier *Phyllotreta*-Arten vermischt vorhanden, gewöhnlich gelb-streifige und einfarbig dunkle gemeinsam. Von ersteren ist es zumeist *Phyl-lotreta undulata* Kutsch., dann *nemorum* L. und *vittula* Redt., seltener ist unter ihnen *vittata* Fab. (*sinuata* Redt. nec Steph.); von den dunklen ist die gemeinste *nigripes* Fab. (*lepidii* Koch), dann *atra* Fab. und *cruciferae* Goeze, selten *aerea* All. In West-europa tritt *consobrina* Curtis zu den dunklen, in Südeuropa *variipennis* Boield. und etliche andere zu den gelbstreifigen Arten. Die nume-

rische Zusammensetzung nach Arten schwankt je nach dem Landstriche, nach lokalen Wärme- und Feuchtigkeitsverhältnissen und anderem.

Nachstehend ein Detailbild der Arten für mitteleuropäische Verhältnisse.

Phyllotreta nigripes Fab.

(*lepidii* Koch)¹⁾. Fig. 12.

Wenig ist dieses Tier in landwirtschaftlichen Werken erwähnt, nirgends ist es weit genug in den Vordergrund gerückt, an jene Stelle, die ihm seiner tatsächlichen Bedeutung nach zukommt. Diese Art — allerdings in schwer trennbarer Gemeinschaft mit einer Anzahl der angeführten anderen gemeinen *Phyllotreta*-Arten — wäre noch am ehesten als der typische Kohlerdfloh, der „Kohlerdfloh“ kurzweg, zu bezeichnen; sie stimmt auch hinsichtlich der Körper- und Extremitätenfärbung am besten mit dem sagenhaften Kohlerdfloh „*Haltica oleracea*“ — der mit der wirklichen *Haltica oleracea* nicht identifiziert werden darf — überein.

Die *Phyll. nigripes* ist ein flohgroßes, von oben her flachgedrücktes Tier von mattgrüner bis blaugrüner, seltener düster metallgrüner Färbung, äußerst fein punktierter, schwach glänzender (seidenglänzender) Oberseite und vollständig schwarzen Extremitäten. Letzteres Merkmal macht es für den Laien vielleicht am besten kenntlich, denn bei allen anderen einheimischen kohlschädlichen Erdflöhen ist das zweite und dritte Fühlerglied zumindest unterseits mehr oder weniger rötlichgelb oder gelbrot gefärbt.

Die *Phyll. nigripes* findet sich vom ersten Frühling bis in den Winter hinein wohl auf allen kreuzblütigen Pflanzen, wildwachsenden wie kultivierten. Mir ist zumindest keine bekannt, die sie grundsätzlich verschmähen würde. Ja, ich habe etlichemale die eigentümliche Erscheinung festgestellt, daß in Gärten, die gemischt mit Gemüse- und Zierpflanzen besetzt waren und in denen es auf dem kreuzblütigen Gemüse von den gemeinen Arten *Phyll. atra* Fab., *cruciferae* Goeze, *nigripes* Fab., *undulata* Kutsch., usw., in bunter Gesellschaft wimmelte, die kreuzblütigen Zierblumen (zumeist Arten der Gattungen *Cheiranthus*, *Matthiola*, *Hesperis*, *Iberis* usw.), die unmittelbar daneben standen, vielfach vorwiegend — manchmal sogar fast ausnahmslos — von der *Phyll. nigripes* befallen waren, während die anderen *Phyllotreten* auf diesen Pflanzen mehr oder minder selten waren. Diese Art ist auch die einzige von den Cruciferen-*Phyllotreten*, die auf den mit den Kreuzblütlern systemverwandten *Resedaceen* regelmäßig auftritt und so gleichsam einen biologischen Übergang von den Cruciferenfressern zu den typischen Resedabewohnern *Phyll. nodicornis* Marsh. (*antennata* Koch) und *procera* Redtb. darstellt. Ausnahmsweise befällt *Phyll. nigripes* auch die kultivierten Kapuzinerkressen (*Tropaeolum* sp.); allerdings leisten ihr auf letzteren Pflanzen wieder die oben genannten gemeinen Cruciferengäste Gesellschaft. Das letzterwähnte Abweichen von den regulären, sonst peinlich eingehaltenen Nährpflanzen aus der Familie der Cruciferen erscheint auffällig; ich hatte jedoch selbst Gelegenheit (Botanischer Garten in Wien) mich von dieser bereits in der Literatur erwähnten Tatsache zu überzeugen. Trotz dieser Einschränkungen dürfte

¹⁾ Um eine neuerliche Namensänderung zu vermeiden, belasse ich den Namen *nigripes* Fab. aufrecht. Ich vermag mich jedoch nicht für die Anschauung zu erwärmen, daß *Fabricius* mit seiner kaum hierher passenden Diagnose wirklich dieses Tier gemeint haben sollte.

Phyll. nigripes doch so ziemlich die umfangreichste Speisekarte unter ihren Verwandten besitzen. Auf Pflanzen anderer Familien gehen die *Phyllotreten* normal nicht über. Das häufige Vorkommen der *Phyll. nigripes* im Laub von Büschen und Bäumen (besonders Eichen, Weißbuchen, Ulmen usw.) ist eine unaufgeklärte Tatsache, die uns aber vorläufig nicht berechtigt, die genannten Baumgewächse schon als „Nähr“-Pflanzen der Art anzusprechen. Die Baumblätter werden von den Tieren in der Gefangenschaft in der Regel völlig verschmäht und auch bei Hunger nur wenig berührt. Es dürfte sich daher hier um Pflanzen handeln, die aus einer uns unbekannten Ursache, die vielleicht mit der Paarung in irgend einem Zusammenhange steht, bestiegen, bzw. vielleicht angefliegen werden, eine Erscheinung, die bei *Halticinen* verschiedenster Gattungen auftritt.

Die Larve der *Phyll. nigripes*, ihr Aufenthalt und ihre Fraßweise waren bis nun ungeachtet der großen Häufigkeit des Käfers unbekannt. Vor kurzem ist es mir gelungen, sie an Radieschen zu erziehen. Sie ist ein äußerst langgestrecktes, einfarbig weißliches, spärlich behaartes sechsfüßiges Tier mit braungelb chitinierten länglichem Kopf. Erwachsen maß sie (Ende Mai) bis zu 6 mm Länge (gegen 2 mm Käferlänge), erreichte aber nur eine Dicke von kaum mehr als 0,6 mm. Sie lebt in der Erde, in geringer Tiefe nahe der Wurzel, in die sie, ohne tief einzudringen, Galerien frißt. Die weißliche Puppe ruht in der Erde. Dies nur als vorläufige Erwähnung.

Phyllotreta atra Fab.

(*aterrima* Schrank, *melaena* Illig.). Fig. 11.

Von der Größe der Vorigen, glänzend schwarz, oberseits etwas gröber punktiert, die Punkte der Flügeldecken teilweise in Längsreihen angeordnet; das zweite und dritte Fühlerglied mehr oder minder — zumindest unterseits — rötlichgelb oder gelbrot.

Fast ebenso gemein wie die Vorgenannte; besonders auf wilden Kreuzblütlern (Ackersenf, Ackerrettich u. dgl.) und kultivierten Gemüsepflanzen (Kohl-Spielarten, Rettich, Meerrettich u. dgl.). In der Literatur wenig erwähnt, in Wirklichkeit eine der schädlichsten Arten, speziell in trockeneren Lagen.

Larve unbekannt.

Phyllotreta cruciferae Goeze.

(*poeciloceras* Com., *obscura* Illig., *colorea* Foudr.).

Nächstverwandt mit *atra*, von gleicher Größe, Punktierung und Fühlerfärbung, oberseits aber metallgrün oder bläulich schimmernd. Stellenweise häufiger, meist aber minder häufig als die Vorige; hinsichtlich der Art der Schädlichkeit mit dieser übereinstimmend.

Larve unbekannt.

Phyllotreta undulata Kutsch.

Fig. 9.

Die gemeinste unter den gelbstreifigen Arten, zu denen auch die beiden folgenden gehören; in der Größe zwischen diesen beiden stehend, ist sie durchschnittlich eine Spur größer und gewölbter als die vorerwähnten dunklen Arten. Der Halsschild ist schwarz ohne bläulichen oder grünlichen, zuweilen aber mit etwas metallischem Schimmer; die gelbe Binde der Flügel-

decken ist — wie auch bei den beiden nächstgenannten Arten — an ihrem äußeren Rande nur sehr sanft geschweift; an dem inneren Rande ist sie bei *undulata* vorne und rückwärts deutlich nach innen gebogen. Auf diese Art beziehen sich wohl die meisten von früheren Autoren gebrachten Schädlichkeitsangaben der *Haltica* (richtig *Phyllotreta*) *flexuosa*, *sinuata* und *nemorum*. Erstere zwei Arten, bei denen die gelbe Binde am Außenrande stark (oft fast halbkreisförmig) ausgeschweift ist, sind relativ viel seltener (besonders *flexuosa*) und mehr Bewohner feuchterer Orte; Cruciferenbewohner sind allerdings auch sie.

Phyll. undulata kommt allenthalben vermischt mit den vorigen Arten, deren Lebensgewohnheiten sie als Käfer teilt, vor und wird äußerst schädlich. Ausnahmsweise findet sie sich auch auf *Kapuzinerkressen* und (sehr selten) auf *Reseda*.

Larve unbekannt.

Phyllotreta nemorum L.

Fig. 8.

Die größte und gewölbtste unter den genannten gelbstreifigen Arten ($2\frac{1}{2}$ —3 mm lang). Der Halsschild besitzt in der Regel einen bläulichen oder grünlichen Schimmer; die gelbe Längsbinde der Flügeldecken ist an der Basis nicht merklich der Naht zugebogen, die Färbung der Fühler und Beine ist etwas heller als bei den vorgenannten Arten (Schienen und Tarsen rötlich-gelb).

Diese Art ist allerdings ein arger Schädling, doch wohl nicht der allerwichtigste, wie man nach der Rolle, die sie in der Fachliteratur spielt — weil *Taschenberg* und etliche andere zufällig gerade ihre Entwicklung beobachtet haben — annehmen müßte. Die Beobachtung der Entwicklung gerade dieser Art ist nämlich ausnahmsweise leicht, da die Larve in großen Blattminen in Cruciferen oberirdisch lebt, dem Kundigen also sofort auffällt¹⁾. Hierzulande tritt die *nemorum* gegen *Phyll. nigripes*, *undulata* und selbst gegen *atra* etwas in den Hintergrund.

In älteren und vielfach auch in neueren Werken ist der Name „*nemorum*“ immer noch der Inbegriff aller gelbstreifigen Erdflöhe überhaupt und unter ihm läuft manches, das sicher auf andere gelbstreifige Arten ganz oder teilweise zu beziehen ist.

Phyllotreta vittula Redt.

Fig. 10.

Eine in Österreich sehr verbreitete Art. Als kleinste der drei gelbstreifigen Schädlinge ist sie auch kleiner als die dunklen Arten, flach gebaut, der Halsschild mit bläulichem oder grünlichem Schimmer, der Innenrand der ziemlich geraden gelben Längsbinde ist vorne nicht nach innen gebogen, sondern läuft gerade bis zur Halsschildbasis.

Trotz ihrer großen Häufigkeit in Stadt und Land scheint sie jedoch als Gartenschädling eine geringere Rolle zu spielen als die Vorige; ich habe sie wenigstens auf kreuzblütigen Kulturgewächsen nur in geringer Zahl gefunden.

¹⁾ Die Entwicklung stellen dar: *Le Koux*, Transact. of the entomolog. Soc. of London. 1837. p. 24. — *Taschenberg*, Naturgesch. der wirbellosen Tiere, die in Deutschland usw. den Feld-, Wiesen- und Weidekulturpflanzen schädlich werden. (Leipzig 1865. p. 73—74) u. a.

Da sie sich vielfach an Orten findet, wo größere Cruciferen nicht nachweisbar scheinen, gewinnen die Beobachtungen Spångbergs und Lindemanns ein erhöhtes Interesse¹⁾.

Den hier skizzierten sechs Arten reihen sich etliche andere, seltenere an, die ab und zu lokal wohl auch als Schädlinge auftreten können, die aber keinesfalls als typische Kohlschädlinge hingestellt werden dürfen. Hierher zählt beispielsweise die große *Phyll. armoraciae* Koch (Fig. 4), mit gelben Flügeldecken und schwarzem Naht- und Seitensaum, ein durchaus nicht häufiges Tier, das fast nur auf Meerrettich (*Armoracia rusticana* G. M. Sch.) vorzukommen scheint. Hierher zählt *Phyll. sinuata* Redt. (richtig *vittata* Fab.²⁾) (Fig. 7), die in Nordamerika sehr schädlich sein soll, bei uns aber weniger häufig im Kulturland auftritt und gern feuchteres Freiland bewohnt; weiter auch *Phyll. flexuosa* Illig., von der hinsichtlich der Standorte Gleiches gilt, die aber selten ist. Die in der Literatur mehrfach genannten Namen dieser Arten sind, wie bereits erwähnt, wohl fast ausnahmslos als irrig Bezeichnungen für eine der vorgenannten gelbstreifigen Arten zu deuten, deren sichere Nomenklatur ja erst spät³⁾ festgestellt worden ist und die im praktischen Leben wohl heute noch fortgesetzt vermengt werden, daher fast nur von *nemorum* gesprochen wird. Wohl noch weniger als die beiden oben Genannten kommen als Schädlinge in Betracht die sehr kleine, kurze, hochgewölbte, keineswegs häufige *Phyll. exclamations* Thunb., deren gelbe Längsbinde auf jeder Flügeldecke zumeist in zwei Flecken aufgelöst ist (obwohl gerade diese Art, die auf extrem feuchtigkeitsliebenden Cruciferen, wie beispielsweise *Nasturtium* u. dgl. lebt, in der Literatur unter dem älteren Synonym *brassicae* vielfach irrig als wichtiger Kohlschädling genannt wird), die größere hellbeinige, gleichfalls feuchte Gründe bevorzugende *Phyll. ochripes* Curt., die sich verstreut auf *Alliaria officinalis* Andr. u. a. findet, und die sehr große, dunkelfärbigere *Phyll. tetrastigma* Com., die *Nasturtium* und *Cardamine* an quelligen Stellen bewohnt.

Von den einfarbig dunklen Arten kommt für eine ausnahmsweise Gemüseschädigung eventuell noch in Betracht die kleine, flache, schwarze, äußerst fein punktierte *Phyll. aerea* All., die ich lokal, aber im allgemeinen recht selten, in und außer Gärten antraf; in Westeuropa ist auch *Phyll. consobrina* Curt. ab und zu schädlich aufgetreten. Damit

¹⁾ Spångberg, Jacob, Notice sur les dégâts des pucerons dans les champs d'orge. (Anales de la Socied. espan. de Hist. nat., VIII. Madrid 1879. p. 339—341), und Lindemann, K., Über die Lebensweise und Entwicklung der *Haltica vittula* Redtb. (Bull. de la Soc. impér. des Natur. de Moscou. 1887. p. 193—197). Ersterer beobachtete die *Phyll. vittula* — und in geringer Zahl auch die *Phyll. atra* — bei Stockholm als Schädling an Gerste (!); letzterer schildert eingehend die in Rußland beobachtete Schädlichkeit der *Phyll. vittula*, speziell ihrer Larve, an Roggen (!). — Ich habe das Vorkommen von Phyllotreten an Gramineen bis jetzt nicht mit Sicherheit nachweisen können. — Die von Lindemann abgebildete Larve darf man wohl ohne weiteres für eine Phyllotretenlarve ansprechen. Eine *Phytomyza*-Larve aber — wie Bedel (Faune des Coléop. du Bassin de la Seine. V. p. 299) meint — ist das Tier sicherlich nicht.

²⁾ Vgl. meine Studie: Welche Halticinenarten gehören Europa und Nordamerika gemeinsam an? (Verhandl. d. k. k. zoolog.-botan. Gesellsch. Wien. Bd. 61. p. 1—20.)

³⁾ Erst Kutschera, F., Beiträge zur Kenntnis der europäischen Halticinen (Wien. entomol. Monatsschr. IV. 1860. p. 301) klärte diese Gruppe und schuf für die gemeinste gelbstreifige Art den Namen *undulata*.

aber wäre die Reihe der kohlschädlichen *Phyllotreten* Mitteleuropas wohl geschlossen.

Der Grad der Häufigkeit der genannten *Phyllotreta*-Arten variiert — wie bereits erwähnt — ortweise einigermaßen. Im ziemlich trockenen, der pontischen Pflanzenformation angehörenden Wiener Becken spielen die einfarbig dunklen Arten, besonders *Phyll. nigripes* und *atra*, neben der gelbstreifigen *Phyll. undulata* die größte Rolle. Aus Gärten der baltischen Pflanzenformation, der typisch deutschen, die durch durchschnittlich feuchtere, kühlere Lagen ausgezeichnet ist, sah ich vielfach die gelbstreifige *Phyll. undulata* und *nemorum* als Dominanten, wogegen die einfarbigen Arten, sogar *nigripes*, zuweilen mehr zurücktraten und unter den gelbstreifigen Arten die mehr feuchtigkeitsliebende, im Wiener Becken ziemlich seltene *vittata* Fab. (*sinuata* Redt., nec Steph.) eingestreut war.

Das gegebene Bild wird aber im wesentlichen hierdurch nicht verändert.

2. Gattung: *Psylliodes* Latr.

Nach den Beobachtungen Taschenbergs¹⁾ an *Psylliodes chrysocephala* habe ich an anderer Stelle²⁾ der Ansicht Raum gegeben, daß die cruciferenschädlichen *Psylliodes* zumeist im Larvenstadium überwintern dürften. Weitere Beobachtungen und Überlegungen lassen mir jedoch diese Anschauung für einige Arten etwas zweifelhaft erscheinen. Über die einzige als eigentlicher Schädling gemeldete *Psyll. chrysocephala* mangeln mir allerdings genauere Eigenbeobachtungen. Andere cruciferenbewohnende *Psylliodes*-Arten jedoch finden sich in der Wiener Gegend noch im letzten Herbst oder bereits im ersten Frühlinge — z. B. *Psyll. cuprea* Koch, *aerea* v. *austriaca* m., *napi* Fab. —, so daß für sie ein Überwintern des fertigen Käfers angenommen werden muß. Daß auf anderen Pflanzenfamilien heimische *Psylliodes*-Arten vielfach überwintern — z. B. der Hopfenschädling *Psyll. attenuata* Koch und der Kartoffelschädling *Psyll. affinis* Payk. — ist ja lange bekannt.

Wie dem indes auch sein möge, jedenfalls ist diese Frage ohne Belang für die Schädlichkeit der Gattung, denn ein Massenauftreten von Imagines dieser Gattung im ersten Frühlinge auf den Keimpflänzchen kreuzblütiger Kulturgewächse ist meines Wissens noch nie beobachtet worden. Damit entfällt aber auch der gefürchtete Sämlingsfraß, der eigentliche Erdflohschaden großen Stiles, wie er von der Gattung *Phyllotreta* angerichtet wird. Allerdings mag manche Pflanze später noch der im Stengel bohrenden *Psylliodes*-Larve zum Opfer fallen; doch ist diese Schädlichkeit — zumindest so weit es sich um die in Gärten kultivierten Kreuzblütler handelt — wenig beobachtet und zumeist wohl auch ohne größere Bedeutung. Es kommen auch nur wenige *Psylliodes*-Arten als Kreuzblütlerschädlinge in Betracht und diese sind nur ausnahmsweise in größerer Individuenzahl vorhanden.

Die cruciferenbewohnenden *Psylliodes* sind durchschnittlich beträchtlich größer als die *Phyllotreten* (3—4 mm), gedrungener und gewölbter gebaut,

¹⁾ Taschenberg, E. L., Naturgeschichte d. wirbellosen Tiere, die in Deutschland usw. den Feld-, Wiesen- und Weidekulturpflanzen schädlich werden. Leipzig 1865. p. 69—72; auch in späteren Arbeiten dieses Altmeisters der angewandten Entomologie.

²⁾ Die Sage vom Kohlerdfloh. (Verh. zool.-bot. Ges. Wien. Bd. 62. 1912. p. 78 und 80.)

niemals gelbstreifig oder rein schwarz, sondern durchwegs gelb, blau, blaugrün bis metallisch braun gefärbt. Von den Phyllotreten sind sie leicht zu unterscheiden durch zehngliedrige Fühler (vgl. Fig. 14) und durch den eigenartigen Bau der Hinterbeine (vgl. Fig. 2 und 13). An diesen sind nämlich die Fußglieder nicht am Ende der Schiene angesetzt, sondern entspringen oben auf der Schiene, ungefähr im hinteren Drittel derselben. Der Halsschild trägt ebenso wie bei *Phyllotreta* niemals eine Querfurche, wodurch sich auch diese Gattung auf den ersten Blick von der Gattung *Haltica* unterscheidet. Die Flügeldecken bei *Psylliodes* zeigen stets völlig regelmäßige Punktstreifen mit glatten oder fein punktierten Zwischenstreifen (vgl. Fig. 14), wogegen sie bei *Phyllotreta* verworren punktiert sind und höchstens hie und da Spuren einer unregelmäßigen Reihung der Punkte — in den mittleren Teilen der Flügeldecken — aufweisen. (Näheres über *Psylliodes* aus den angefügten Bestimmungstabellen und den Figuren 2, 13—18.)

Nach den angegebenen Merkmalen dürfte es wohl auch dem Laien möglich sein, mit Hilfe einer mittelmäßigen Lupe die drei Gattungen: *Phyllotreta* (Fig. 4—12), *Psylliodes* (Fig. 14) und *Haltica* (Fig. 1) (letzte Gattung ist weiter unten noch kurz charakterisiert), sicher voneinander zu unterscheiden.

Psylliodes chrysocephala L.

Fig. 14.

Taschenberg¹⁾ hat diesen großen, zirka 4 mm langen, blaugrünen Käfer mit dem rotgelben Vorderkopf und den völlig rotgelben Vorder- und Mittelbeinen als Schädling von Winterraps und Rüben beobachtet und seine Entwicklung beschrieben. Von diesen Angaben Taschenbergs lebte bis heute ein großer Teil der Schädlingliteratur und sie sind hierdurch zu einer Popularität und Verbreitung gelangt, die eine etwas störende Einseitigkeit im Bilde der Schädlichkeit der Halticinen zur Folge hatten. Kein Zweifel, daß diese Art als Rapschädling in der von Taschenberg geschilderten Weise eine Rolle gespielt hat. Da der Rapsbau hierzulande jedoch fast nie von Kleinbauern, sondern nur von Gutsherrschaften gepflegt wird und überdies seit der ausgedehnten Verwendung der Mineralöle zu Beleuchtungs- und sonstigen technischen Zwecken stark zurückgegangen ist, steht er nicht mehr an der Stelle wie einst, wogegen die Gemüseschädlichkeit der *Phyllotreten* an allgemein wirtschaftlicher Bedeutung zuverlässig nicht abgenommen hat. Als Gartenschädling ist diese *Psylliodes* wohl von geringem Belang.

Die gestreckte, schmutzigweiße Larve mit bräunlich chitinisiertem Kopf und ebensolchen Platten auf dem ersten und letzten Segment ist ungefähr 7—9 mm lang und besitzt drei Beinpaare; sie lebt in den Stengeln, die sie ausfrißt, und verpuppt sich im Mai in der Erde.

¹⁾ Taschenberg, E. L., Naturgesch. d. wirbellosen Tiere, die in Deutschland usw. den Feld-, Wiesen- und Weidekulturpflanzen schädlich werden. Leipzig 1865. p. 69—72. In den späteren Publikationen Taschenbergs sind diese Angaben reproduziert. — Eine ausführliche Beschreibung und Abbildung der an Kohl beobachteten Larve hat George H. Carpenter im Journ. of Econ. Biol. 1906. p. 152—156 (auch in Econ. Proceed. of the Roy. Dublin Soc. 1907. p. 427—430) gegeben.

Psylliodes napi Fab.

(Psyll. rapae Illig.) Fig. 15 (Kopf).

Eine etwas kleinere (meist $2\frac{1}{2}$ —3 mm lange), gewölbte, blaue oder grünliche *Psylliodes* mit völlig dunklem Kopf und in der Regel hellen Vorder- und Mittelbeinen. Sie wird gleichfalls von Cruciferen der Kohlverwandtschaft gemeldet, lebt aber in der Regel auf wildwachsenden Cruciferen feuchterer Standorte.

Die Larve stimmt in Aussehen und Lebensweise mit der der vorgenannten Art ziemlich überein¹⁾.

Als ausnahmsweise Schädlinge an kreuzblütigem Gemüse könnten aus dieser Gattung nur noch wenige in Betracht kommen, so *Psylliodes cuprea* Koch (*obscura* Duft., *herbacea* Foudr.), *cupreata* Duft. (Näheres enthält die angeschlossene Bestimmungstabelle.) Die übrigen cruciferenbewohnenden Arten sind relativ selten, dürften größtenteils ganz bestimmten Freilandpflanzen angepaßt sein und können aus der Schädlingsliteratur wohl ohne weiteres ausgeschaltet werden.

Damit ist das Bild der cruciferenschädlichen Erdflöhe völlig erschöpft und wir können rekapitulieren:

Auf kreuzblütigen Kulturpflanzen leben nur Erdflöhe aus den Gattungen *Phyllotreta* und *Psylliodes*. Die Gartenschädlinge des Frühlings, die flohgroßen schwarzen, gelbstreifigen oder grünen Vernichter der Aussaat sind nur *Phyllotreten*.

II. Die geschädigten kreuzblütigen Kulturpflanzen.

Die genannten Erdfloharten sind an kreuzblütige Pflanzen gebunden und greifen nur in seltenen Ausnahmefällen Pflanzen anderer Familien an; z. B. finden sich *Phyllotreten* an *Reseda*-Arten — die übrigens mit den Cruciferen systematisch nächstverwandt sind — außerdem an Kapuzinerkressen, *Tropaeolum*, und angeblich sogar an Getreide (*Phyll. vittula*). Diese Ausnahmen bestätigen jedoch lediglich die Regel und es ist unbedingt falsch, wenn von Kohlerdflöhen angegeben wird, daß sie auch Runkelrüben, Kartoffeln, Erbsen u. dgl. schädlich werden. Letztere Pflanzen werden ausnahmslos von ganz anderen Erdfloharten, die wieder diesen Pflanzen besonders angepaßt sind, befallen. Wir können also die „Kohlerdflöhe“ auch hinsichtlich des Pflanzenbefalles klar und mit voller Berechtigung von allen anderen abtrennen.

Von geschädigten Kulturpflanzen der Kreuzblütlerfamilie kommen vorwiegend in Betracht:

A. Gemüse und sonstige Küchengewächse.

(Blatt- und Wurzelgemüse, Gewürzpflanzen.)

An erster Stelle steht *Brassica oleracea*, der Kohl, mit allen Spielarten, deren Saatzpflanzen im Frühlinge ausnahmslos durch die besprochenen *Phyllotreta*-Arten gefährdet werden. Es sind die Blatt-, Stengel- und Wurzelgemüse der zahlreichen Kohl- und Krautsorten und der kreuzblütigen Rüben (dagegen *Beta vulgaris*, die Umbelliferenrüben usw., ausgeschlossen).

¹⁾ Ihre Beschreibung bei Goureau, Ann. de la Soc. entomol. de France. 1864. p. 668; beobachtet in Brunnenkresse.

Brassica napus und *Brass. rapa* stellen vorwiegend Wurzeln (Steckrüben, weiße Rübe, Halmrübe, Speiserübe, Wasserrübe, Turnip usw.) als Gemüse. Desgleichen *Raphanus sativus*, der Rettich, und *Armoracia rusticana*, der Meerrettich oder Krenn.

Seltener gebaut werden:

Crambe maritima — Meerkohl.

Lepidium (*Cardamon*) *sativum* — Gartenkresse.

Nasturtium officinale (*Roripa nasturtium*) — Brunnenkresse.

Cochlearia officinalis — Löffelkraut.

Von Gewürzpflanzen nur die Senarten:

Sinapis alba — Weißer Senf.

Sin. nigra (*Brassica nigra*) — Schwarzer Senf.

N. B. Unter den großen Blattgemüsen werden von Erdflöhen alle Nicht-Cruciferen, wie Salat, Endivie, Spinat usw., nicht angegriffen. Auf Runkelrüben lebt im südlichen Mitteleuropa die Halticine *Chaetocnema tibialis* Ill., auf Kartoffeln *Psylliodes affinis* Payk.

B. Öl- und Färbepflanzen.

Befallen werden in erster Linie die feldmäßig gebauten, kreuzblütigen Ölsaaten:

Brassica napus oleifera (*aestiva*, *hiberna*) — Winter- und Sommer-Raps, Raps, Ölrap, Rübsaat, Kohlsaar (siehe *Psylliodes chrysocephala* als spezieller Schädling).

Brass. rapa campestris (*oleifera*, *praecox*, *annua*, *hiberna*) — Rübenrap, Sommer- und Winterrübs, Rübsen.

Raphanus sativus oleifera — Ölettich.

Heute ziemlich ohne Bedeutung sind die befallenen Färbepflanzen:

Isatis tinctoria — Färbewaid, Waid.

Reseda luteola — Wau, Wilde Resede (Befall: *Phyllotreta nigripes*, *nodicornis*, *procera*).

C. Zierpflanzen.

Der Befall erstreckt sich wohl auf alle als Ziergewächse gezogenen Kreuzblütler. Ich nenne von den beliebten¹⁾:

Arabis alpina — Gänsekresse.

Cheiranthus (*Matthiola*) *annuus*, *autumnalis*, *incanus* — Levkojen.

Cheiranthus Cheiri — Goldlack, Gelbveigl.

Cheiranthus maritimus — Meerstrandslevkoje.

Matthiola bicornis.

Hesperis matronalis, *tristis* — Nachtviole.

Lunaria biennis — Mondviole, Judas-Silberling.

Iberis amara, *coronaria*, *odorata*, *umbellata*, *gibaltarica*, *sempervirens*, *Tenorcana*, *pinnata* — Schleifenblumen.

Alyssum saxatile, *Benthami* — Steinkraut.

Brassica oleracea var. — Zierkohl.

Von Nicht-Cruciferen werden befallen:

Reseda odorata — Resede (vorwiegend von *Phyllotreta nigripes* und *nodicornis*).

Tropaeolum majus, *canariense*, *Lobbianum* — Kapuzinerkressen.

D. Unkräuter.

Die Vertreter dieser Pflanzengruppe stehen eigentlich außerhalb des Programms vorliegender Ausführungen. Da aber gerade die Familie der Cruciferen einige der allergemeinsten Acker- und Gartenunkräuter umfaßt und da die auf diesen wohnenden Erd-

¹⁾ Die Benennung ist die in der Praxis und im Handel gebräuchliche.

flöhe ohne Ausnahme den gleichen Arten angehören wie die Erdflöhe der Kulturcruciferen, so leuchtet die Bedeutung dieser Unkräuter als Erdflohwiegen, als Ausgangsstätten des Befalles, ohne weiteres ein und erscheint zumindest ihre Erwähnung an dieser Stelle gerechtfertigt.

Die gemeinsten, fast immer von Erdflöhen (vorwiegend *Phyllotreta undulata*, *nemorum*, *nigripes*, *atra*, *cruciferae*) besetzten Unkrautcruciferen sind:

Sinapis arvensis — Ackersenf,

Raphanus raphanistrum — Ackerrettich, Hederich; beides unvermeidliche, gelbblühende, üppige Gäste auf Acker und Unland¹⁾. An ihre Seite stellt sich in der Gegend um Wien das weißblühende *Lepidium draba*, die grauflaumige Kresse, typisch für Erdhänge, Straßengraben, Unland aller Art.

Je nach Art und Lage des Kulturstückes kommen als in- oder umwohnende kreuzblütige, also erdflohzüchtende Unkräuter auch noch andere Gattungen, beispielsweise *Sisymbrium* (besonders *Sis. sophia* und *officinale*), *Alliaria*, *Erysimum*, *Barbarea*, *Roripa*, *Berteroa*, *Camelina*, *Thlaspi* usw. in Betracht.

Auf alle diese ist demnach gegebenenfalls entsprechend zu achten.

Was auf vorgenannten Pflanzengruppen an Erdflöhen regelmäßig und in Anzahl auftritt, gehört ohne Ausnahme den obcharakterisierten Arten der Gattung *Phyllotreta*, seltener der Gattung *Psylliodes*, niemals der Gattung *Haltica* (im heutigen Sinne) an.

Es dürfte — wie bereits erwähnt — nach dem hier Gesagten auch dem gebildeten Landwirte nicht schwer fallen, mit Hilfe einer besseren Lupe wenigstens die Gattungszugehörigkeit jedes beobachteten Kohlerdflohs sicherzustellen. Und wer die Unsicherheit der einschlägigen Angaben in der heutigen Fachliteratur kennt, der wird den hohen Wert dieser anseheinend so geringfügigen Möglichkeit, als der Anbahnung eines sicheren Allgemeinwissens, richtig einschätzen.

III. Die irrig der Kohlschädlichkeit beschuldigten Erdflöhe.

Mancher würde — ohne die einleitenden Bemerkungen dieses Aufsatzes — bei Durchsicht des Voranstehenden wohl vergeblich auf eine Erörterung über den eigentlichen und richtigen „Kohlerdfloh“ der Literatur — sozusagen die gewohnte Verkörperung des Erdflohbegriffes — die *Haltica oleracea* L., gewartet haben. Diese *Haltica oleracea* (Fig. 1) aber ist, ungeachtet ihres Namens und ungeachtet alles dessen, was bis auf den heutigen Tag über sie geschrieben worden ist, kein Kohlerdfloh. Sie schädigt kein Gemüse — die belanglose Rhapontikawurzel etwa ausgenommen — und lebt überhaupt auf keiner kreuzblütigen Pflanze. In meinem etwas früher erschienenen Aufsatz, der speziell dieses Tier zum Gegenstande hat²⁾, habe ich diese Tatsachen ausführlich dargelegt und kann mich hier neben dem Hinweis darauf auf eine kurze Zusammenfassung und einige ergänzende Bemerkungen beschränken.

In erster Linie ist Stellung zu nehmen gegen die viel mißbrauchte, nichtsagende und dennoch völlig unzutreffende Behauptung, dieser Käfer lebe „auf den verschiedensten Pflanzen“. Es gibt — das sei ausdrücklich festge-

¹⁾ Man könnte demnach, wenn es nicht von vorneherein allzu absurd klinge, sogar von einem theoretischen einseitigen Nutzen der Erdflöhe durch Schädigung dieser Ackerunkräuter sprechen. Allerdings wird diese Art der Nützlichkeit kaum je sichtbar in Erscheinung treten und verdient keinerlei ernste Beachtung.

²⁾ Die Sage vom Kohlerdfloh, I. c. — Von den Kohlerdflöhen ist die *Haltica* leicht zu unterscheiden durch beträchtliche Größe und durch das Vorhandensein einer Querrfurche im hinteren Halsschildteile, von *Psylliodes* speziell noch durch 11gliedrige Fühler, verworren punktierte Flügeldecken und einfachen Hinterschienenbau.

stellt — überhaupt keine Halticine, die die „verschiedensten“ Pflanzen befällt. Sorgfältige Beobachtungen ergeben stets, daß jede Art ihren eigenen, kleinen, scharf umgrenzten Nährpflanzenkreis besitzt, der zuweilen nur eine einzige Pflanzenart, vielfach nur eine einzige Pflanzengattung, zumeist aber etliche nahe verwandte Pflanzengattungen oder eine Familie, und nur selten mehrere Pflanzen verschiedener, nicht miteinander verwandter Familien umfaßt¹⁾.

Ich gebe nun ohne weiteres zu, daß gerade die *Haltica oleracea* hierin vielleicht das Mögliche leisten könnte. Die Gattung *Haltica* scheint mir in mancher Hinsicht phylogenetisch tieferstehend, minder spezialisiert, den zweifellos älteren eigentlichen Chrysomeliden noch näherstehend als die Mehrzahl der übrigen Halticinengattungen. Details in der Bauart deuten darauf hin, das Baum- und Strauchleben einiger ihrer Vertreter, der Bau und die Lebensweise der Larven, die frei auf Blättern fressen, wogegen die Larven der meisten übrigen Halticinengattungen ins Pflanzeninnere oder an die Wurzel gegangen sind.

Ich habe die gemeine *Haltica oleracea* nun allerdings vielfach an Orten gefunden, wo ich Pflanzen der nachangeführten Gruppen nicht mit Sicherheit nachweisen konnte und gebe ohne weiteres zu, daß die Art noch auf anderen Gewächsen als den hier angegebenen und deren Verwandtschaft leben kann. Ich lehne jedoch alle nicht experimentell belegten Angaben ab und gelange dadurch nur zu den wenigen, sichergestellten Nährpflanzen, die durch vielfache Beobachtungen zweifelfrei erhärtet sind.

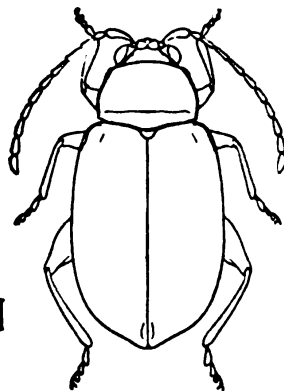


Fig. 1.

Die *Haltica oleracea* lebt auf Arten der Polygonaceen (Persicariaceen, *Haltica oleracea* L. Knöterichgewächse) und Oenotheraceen, Nachtkerzen- und Weidenröschengewächse). Sie ist samt ihrer Larve aber auch nachgewiesen an *Polygonum aviculare* L., dem Vogelknöterich oder Wegetritt, der kriechend an Wegerändern, Rainen, Äckern und Brachen, Weingärten und Gärten, überhaupt an erdigen Stellen allenthalben häufig wächst und seiner Unansehnlichkeit halber wohl zumeist übersehen, bzw. in keinen Zusammenhang mit dem relativ großen Käfer gebracht wird, der dann von irgendeiner augenfälligen, darüberstehenden Pflanze, auf die er zufällig gerät und mit der er keine ursächliche Gemeinschaft hat, gemeldet wird.

Neben dieser Art leben noch zwei andere Blattkäfer auf dem Vogelknöterich: die charakteristische, träge Chrysomeline *Gastroidea* (*Gastrophysa*) *polygona* L. mit blauem oder grünem Kopf, ebensolchen Flügeldecken und gelbrotem Halsschild, das trüchtige Weibchen mit hochaufgetriebenem, orangefarbenem Hinterleib — und der kleine, erzbraune Erdflöhen *Chaetocnema concinna* Marsh., der auch auf anderen Knöterich- und auf Ampferarten lebt. Die *Haltica oleracea*

¹⁾ Ich habe diesen Gegenstand vor kurzem ausführlich behandelt (Zur Praxis des Käferfanges mit dem Kätscher, III. Die Standpflanze. Wien. entomolog. Zeitung. 1912. p. 199—210). Im Sinne der dort gegebenen Einteilung der Phytophagie sind die Halticine (nach den heute vorliegenden (sicheren) Beobachtungen ausnahmslos oligophag (eventuell monophag), nicht aber polyphag.

hat in Gefangenschaft die Blätter des *Polygonum aviculare* bereitwillig als Nahrung angenommen.

In Waldschlägen, zwischen Buschwerk u. dgl. lebt die *Haltica oleracea* auf *Chamaenerium* (*Epilobium*) *angustifolium* L., dem schmalblättrigen Weidenröschen. Auf dieser Pflanze hat auch Taschenberg die Entwicklung der Art beobachtet. Gefangene Käfer haben bei den von mir angestellten Versuchen die Blätter dieser Pflanze stets bereitwillig angenommen. In den Auen der Donau nächst Wien, auf den weiten Schotterflächen des regulierten Strombettes, leben Käfer und Larven gleichzeitig in ungeheurer Anzahl auf *Chamaenerium palustre* Scop. (*Epilobium Dodonaei* Vill.), dem rosmarinblättrigen Weidenröschen. Auch auf anderen *Epilobium*-Arten dürfte die *Haltica* noch nachzuweisen sein.

Zahlreich findet sie sich ferner auf einer nächstverwandten Pflanze, der aus Nordamerika stammenden *Oenothera* (*Onagra*) *biennis* L., der Nachtkerze. Diese Pflanze mit den auffällig großen, gelben Blumen findet sich im wilden Zustande nicht selten, besonders in schottigeren Auen, an Dämmen, zwischen Gebüsch. Ihrer kultiviert verdickten und eßbaren Wurzel (*Rhapontica* wurzel, Schinkensalat, französische Rapunzel) halber wird sie hie und da gezogen. Hier läge wohl die Möglichkeit einer Gemüseschädlichkeit der *Haltica oleracea*. Cornelius hat die Entwicklung des Käfers an dieser Pflanze beobachtet; auf *Oenothera* von mir gefangene Käfer haben die Blätter derselben bereitwillig angenommen.

Möglich, daß der Käfer auch auf *Circaea lutetiana* L., dem Hexenkraut, einer Waldpflanze der gleichen Familie vorkommt. Sicher aber findet er sich auf einer Reihe von Zierpflanzen aus dieser Familie; so fand ich ihn auf *Oenothera Fraseri*, *Missouriensis* und *tetraptera*, und Boissduval zitiert ihn noch von den Gattungen *Clarkia*, *Boissduvalia*, *Eucharidium*, *Fuchsia*. Mit Blättern letztgenannter beliebter Zierpflanze angestellte Fraßversuche gelangen mir stets.

Die Angaben anderer Standpflanzen in der Literatur sind mit äußerster Vorsicht aufzunehmen, bezw. ohne experimentell erbrachten Beweis überhaupt abzulehnen. Auch die Bestimmung des Käfers ist einiger nur schwierig davon zu unterscheidender verwandter Arten halber nur dann sicher, wenn — wie in den vorgenannten von mir untersuchten Fällen — der Kopulationsapparat des ♂ zur Determination herangezogen wird.

Daß Cruciferen nicht zu den Standpflanzen dieser *Haltica* zählen, habe ich in dem früher erwähnten Aufsätze ausführlicher dargelegt. Es erübrigt mir nur noch die Bemerkung, daß es mir in letzter Zeit gelungen ist, gefangene *Haltica oleracea* zur Annahme von Kohl zu bewegen. Es handelt sich jedoch nur um einzelne Tiere, die sich zum Kohlfraß bewegen ließen. Andere, gleichzeitig gefangene Exemplare dieser Art haben auch nach mehrwöchentlichem vollständigen Nahrungsmangel frische Kohlblätter nicht berührt. Blätter von anderen Cruciferen, z. B. Rettig, weiße Rübe, Ackersenf usw., wurden überhaupt von keinem Stücke — auch nicht von denen, die sich an dem fleischigen Kohlblatt vergriffen — angenommen.

Ein ausnahmsweiser Fraß unter diesen Umständen besitzt keine Beweiskraft; es handelt sich bei der Schädlichkeit eines Tieres nur um freiwilligen Befall in der Natur und dort ist *Haltica oleracea* oder ihre Larve niemals an Kreuzblütlern fressend gefunden worden.

Ihr Name „Kohlerdfloh“ ist unbedingt zu verwerfen und ebenso ist alles,

was in wissenschaftlichen und praktischen Werken, in Hand- und Schulbüchern je über ihre Schädlichkeit geschrieben wurde, bedingungslos zu löschen, bzw. auf die im Vorangehenden geschilderten tatsächlichen Kohlerdflöhe zu beziehen. Denn es gibt keinen „Kohlerdflöh“, sondern lediglich „Kohlerdflöhe“: eine überall mehr oder minder bunt gemischte Gesellschaft von *Phyllotreta*-Arten.

IV. Dichotomische Bestimmungstabelle der cruciferenbewohnenden Erdflohart des mittleren Europa (Deutschland, Österreich, Schweiz).

Die im folgenden gegebenen Bestimmungstabellen verfolgen den Zweck, dem mit entomologischen Hilfsmitteln — zumindest mit einer sehr scharfen Lupe und terminologischen Vorkenntnissen — Ausgerüsteten die Bestimmung jedes im deutschen Sprachgebiete auf Kreuzblütlern lebend angetroffenen Erdflohes ohne weiteres zu ermöglichen. Nach dem Vorgesagten kommt zumeist die Gattung *Phyllotreta* in Betracht. Die Gattung *Psylliodes* weist einige in systematischer und biologischer Hinsicht noch nicht völlig geklärte Elemente auf, deren sichere Bestimmung vielfach sogar dem Fachsystematiker Schwierigkeiten bereitet und bei der der Nichtfachmann vielleicht zu keinem befriedigenden Resultate gelangen wird. Indessen kommen gerade diese Arten für eine nennenswerte Kulturpflanzenschädigung nicht in Betracht und ich habe ihre Darstellung, so weit dies ohne Beeinträchtigung der Zuverlässigkeit dieser Tabelle angängig war, eingeschränkt.

Eines jedoch muß ich ad vocem Determination mit allem Nachdrucke betonen: Es ist im Interesse der Wissenschaft unbedingt erforderlich, daß jede nach einer Tabelle oder einem Handbuche¹⁾ durch einen Nichtspezialisten vorgenommene Bestimmung irgendeines Tieres vor irgendeiner Veröffentlichung über dasselbe einem Spezialkenner der bezüglichen Tiergruppe zur Revision unterbreitet werde. Die Determination durch einen Nichtkenner — speziell in schwierigeren Gruppen, wie es beispielsweise die *Halticinae* sind, so leicht und einfach sich mancher Laie deren Bestimmung auch vorstellen mag — besitzt unbeschadet seiner sonstigen Qualitäten niemals jenen Grad von Verlässlichkeit, der einer Angabe von streng wissenschaftlich unbedenklicher Verwertbarkeit innewohnen muß. Nur ein unnachsichtliches Festhalten an der Regel, daß jede Bestimmung eines Tieres, soweit dies mit dem Aufgebote aller Mittel erreichbar ist, von Spezialisten — soweit solche vorhanden — besorgt oder zumindest überprüft werde, kann der Phytopathologie den Anspruch sichern, auch von entomologischer Seite voll als Wissenschaft genommen zu werden. Wer jeden springenden, auf Kohl angetroffenen Käfer als „*Haltica oleracea*“ bezeichnet, ohne in ein modernes systematisches Werk zu blicken — ein Fall, der nicht allzuselten war — der begibt sich von vornherein des Rechtes, ernst genommen zu werden und ist — ich stehe nicht an, das Wort zu gebrauchen — als Schädling der Wissenschaft zu bezeichnen.

Ich kenne und würdige die Einwürfe, die mir von fachmännischer Seite gegen die Forderung des Heranziehens der Spezialisten erhoben wurden. Ich gebe gerne zu, daß auch das Wissen letzterer nicht in allen Fällen einwandfrei ist, daß ihnen zumeist das Interesse am lebenden Tiere völlig

¹⁾ Ein „Bestimmen“ durch einfaches Vergleichen mit determinierten Sammlungstücken entzieht sich von vornherein jeder wissenschaftlichen Berücksichtigung.

fehlt und daß sie in diesem Belangen oft eine ein wenig beschämende Hilflosigkeit an den Tag legten. Aber so klar ich auch die Schwächen im eigenen Lager sehe, so wenig kann dies meine Anschauung ändern. Die Determination durch Spezialisten mag in manchen Fällen ein grobes Sieb sein, aber sie ist ein Sieb, und dazu das einzige, das uns zu Gebote steht. Sie ist der einzige Weg, um die angewandte Entomologie aus den Irrwegen auf denen sie hinsichtlich mancher Gruppen heute noch wandelt, herauszuführen. Und neben der Klärung eines kleinen, bescheidenen Spezialgebietes verfolgen diese Zeilen in erster Linie den Zweck, speziell den von botanischer Seite kommenden Phytopathologen vor diesen Irrwegen, deren Vorhandensein er leicht übersieht, zu warnen.

Tabelle der Gattungen.

A. Flügeldecken niemals mit regelmäßigen Punktstreifen, sondern höchstens oben auf dem Rücken mit wenigen mehr oder minder langen, nicht regelmäßigen Reihen von Punkten; die übrigen Teile der Flügeldecken aber ganz regellos punktiert. Fühler mit 11 Gliedern, davon die Glieder 2 und 3 kürzer als alle übrigen (Glieder 2 etwa halb so lang als das sehr lange Grundglied). Die Fußglieder der Hinterbeine sind am Ende der Schiene eingelenkt; das erste (der Schiene zunächst liegende) Fußglied erreicht ungefähr ein Drittel der Schienenlänge (vgl. die Fig. 6—12). Außer blauen, grünen und bronzefarbenen Arten auch eine Anzahl rein schwarzer und gelbgezeichneter; außer eiförmig gewölbten Formen auch flache, gestreckte.

Umfaßt die typischen, schädlichen „Erdflöhe“ der Kreuzblütler, die wirklichen „Kohlerdflöhe“ der Gärten. Gattung: *Phyllotreta* Foudr.

B. Flügeldecken mit 9 vollständigen, regelmäßigen Punktstreifen (vgl. Fig. 14); Fühler nur mit 10 Gliedern, davon die ersten vier Glieder (Zählung vom Kopfe aus) die längsten und untereinander ziemlich gleichlang (vgl. Fig. 14); Fußglieder der Hinterbeine nicht am Ende der Schiene, sondern in einer Rinne auf der oberen Schienenkante, ungefähr ein Drittel bis ein Fünftel

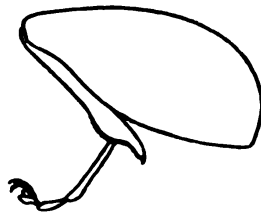


Fig. 2. Hinterbein einer *Psylliodes* (Laufstellung).

(der Schienenlänge) vor der Schienenspitze eingelenkt; das erste (zunächst der Schiene gelegene) Fußglied ist so lang wie die halbe Schiene und wird in der Regel an die Schiene zurückgeklappt (vgl. Fig. 2, 13, 14). Zumeist größere Arten von ziemlich hoch gewölbter, länglich-eiförmiger, gerundeter, geschlossener Körpergestalt; keine flachen, rein schwarzen, gelbgestreiften oder gelbgefleckten Arten (wenigstens nicht auf Cruciferen in Mitteleuropa). Als Gartenschädlinge von geringer Bedeutung. Gattung: *Psylliodes* Latr.

Tabelle der Arten.

A. Gattung *Phyllotreta* Foudr.

- | | |
|--|----|
| 1 Flügeldecken schwarz mit gelber Zeichnung (Längsbinden oder Flecken) | 2 |
| 1' Flügeldecken einfarbig (blau, grün, bronzebraun oder schwarz) . . . | 10 |
| 2 Schulterbeule auf den Flügeldecken ¹⁾ stets ganz oder größtenteils schwarz; | |

¹⁾ Die Schulterbeule ist am deutlichsten kenntlich, wenn der Käfer von vorne her betrachtet wird und das Licht flach über seinen Rücken her einfällt (Fig. 3).

- Flügeldecken mit breiter schwarzer Zeichnung (zumeist wiegt schwarz vor) 3
- 2' Schulterbeule ganz gelb; Flügeldecken vorwiegend gelb; schwarz ist nur ein mäßig breiter, vorn und rückwärts etwas verengter Nahtsaum, der höchstens doppelt so breit ist wie das Schildchen, außerdem ein sehr schmaler Spitzen- und Seitensaum, der im mittleren Teile höchstens so breit ist, wie ein Auge des Käfers; an den Schultern verläßt dieser Seitensaum völlig und läßt die ganze Schulterbeule und Flügeldeckenbasis gelb¹⁾. Kopf und Halsschild schwarz, zuweilen mit schwach bläulichem oder grünlichem Schimmer. An den Fühlern Glied 1—3 hellgelb, 4—11 schwarz; Beine gelb, die Vorder- und Mittelschenkel (mit Ausnahme der Kniegelenke) sowie die ganzen Hinterschenkel schwarz. Eine der größten Arten der Gattung, mit großen, seitlich stark gerundeten aber nicht besonders hochgewölbten Flügeldecken. — Länge 2,8—3,5 mm. — (Fig. 4.)



Fig. 3. Schultern der Flügeldecken (links mit, rechts ohne Beule).

Wohl im ganzen Gebiete, doch nicht häufig; meines Wissens nur auf Meerrettich (Krenn, *Armoracia rusticana* G. M. Sch.) angetroffen. Seit wenigen Jahrzehnten in Amerika eingeschleppt²⁾

Phyllotr. armoraciae
Koch

- 3 Der schwarze Seitensaum der Flügeldecken ist im mittleren Teile sehr stark hochbogig nach innen erweitert, an seiner breitesten Stelle stets mehr als doppelt so breit als an seiner schmalen hinter den Schultern (vgl. Fig. 5A)³⁾. Zuweilen fließt

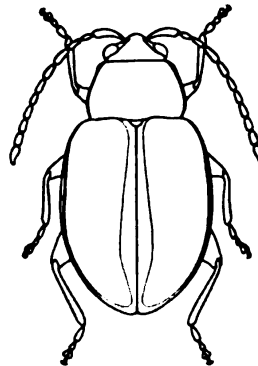


Fig. 4. *Phyllotreta armoraciae* Koch ♂

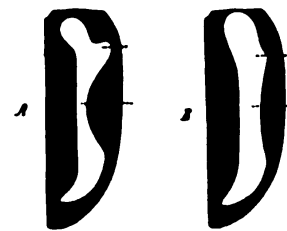


Fig. 5. A Flügeldecke von *Phyllotr. vittata* (Außensaum stark bogig erweitert). B Flügeldecke von *Phyllotr. undulata* (Außensaum flach erweitert).

¹⁾ Die ähnliche *Phyll. ochripes* ab. *burdigalensis* besitzt einen schwarzen Schulterfleck.

²⁾ Chittenden, F. H., *Insect Life*. VII. 1895. p. 404—406. — Heikeringer, F., *Verh. zool. bot. Ges. Wien*. Bd. 61. 1911. p. 16—17.

³⁾ Nur bei *Phyll. ochripes* ab. *burdigalensis* ist die Erweiterung ganz flach, aber dennoch mehr als doppelt so breit als die engste Stelle hinter der Schulter. Dieses Tier ist überdies durch ganz gelbe Vorder- und Mittelbeine von den Arten der nächsten Gruppe (3') zu unterscheiden. — Hier könnte auch Erwähnung finden: *Phyll. variipennis* Boield. (Syn.: *varians* Foudr.), ein südlicheres Tier, welches das hier behandelte Gebiet angeblich in Istrien, in Südtirol und im Elsaß (?) noch berührt, ansonsten in Mitteleuropa aber sicher nicht heimisch ist. Es ist eine kleine, flache, fein punktierte Art vom ungefähren Bau der *Phyll. vittata*, hinsichtlich der Flügeldeckenzeichnung streng genommen in keine der beiden obgenannten Gruppen passend. Bei der Normalform dieser Art ist nämlich der schwarze Seitensaum der Flügeldecken fast der ganzen Länge nach ziemlich gleichbreit, an einer Stelle unmittelbar hinter der Schulter aber äußerst schmal, viel weniger als halb so breit als an der breitesten Stelle in der Mitte der Flügeldecken. Der mäßig breite schwarze Nahtsaum ist vorne und hinten gerundet verschmälert, im mittleren Teile flachbogig erweitert, gerade in der Flügel-

- diese Erweiterung mit dem schwarzen Nahtsaum zusammen und löst so die gelbe Längsbinde in zwei gelbe Flecken auf. Die Arten leben vorwiegend an etwas feuchteren Stellen und kommen — vielleicht mit Ausnahme von *vittata* (*sinuata*) — als Kulturschädlinge größeren Stils nicht in Betracht 4
- 3' Der schwarze Seitensaum der Flügeldecken ist im mittleren Teile nicht oder nur sehr sanft und flachbogig nach innen erweitert, an seiner breitesten Stelle nicht doppelt so breit als an der schmalen hinter den Schultern (vgl. Fig. 5B); die gelbe Längsbinde der Flügeldecken daher bandförmig. Hieher die ärgsten Schädlinge 8
- 4 Alle Beine pechschwarz mit helleren Gelenken; die gelbe Färbung der Flügeldecken tritt hinter der Schulterbeule niemals bis hart an den fein aufgeworfenen Seitenrand heran, sondern läßt stets einen schwarzen Randstreifen von der Breite des Auges des Käfers intakt (vgl. Fig. 5A) 5
- 4' Die Vorder- und Mittelbeine völlig gelb; die gelbe Färbung der Flügeldecken tritt hinter der Schulterbeule bis an den fein aufgeworfenen Seitenrand heran, so daß an dieser Stelle der schwarze Seitensaum nur als kaum fühlender Strich ausgebildet ist; Nahtsaum mäßig breit, vorn und rückwärts sanft bis fast auf halbe Breite verengt. Fühler gelb, in der Außenhälfte gebräunt, beim ♂ das fünfte Glied stark verlängert und etwas erweitert. Bei der aberr. *cruciat* Wse. ist die gelbe Binde in zwei Makeln aufgelöst; bei der aberr. *burdigalensis* Pic ist der schwarze Seitensaum der Flügeldecken auf einen schmalen, ziemlich gleichbreiten Streifen reduziert, der die Breite eines Käferauges nicht erreicht. — Synonym: *excisa* Redtb. — Länge 2—2,5 mm.

Im ganzen Gebiete; nicht gerade selten an feuchten, sumpfigen oder quelligen Orten, besonders unter Buschwerk, auf *Alliaria officinalis* Andr. (*Sisymbrium alliaria* Scop., Knoblauchhederich, Lauchkraut)¹⁾; von anderen auf *Cardamine amara* L. (dem bitteren Schaumkraut), *Roripa amphibia* (Sumpfkresse) u. a. gefunden *Phyllotr. ochripes* Curt.

- 5 Mittlere bis große Arten (1,8—3 mm), mit ausgeprägter Schulterbeule²⁾ 6
- 5' Sehr kleine Art (1,5—1,8 mm), mit verschwindender Schulterbeule. Kurz, gerundet-eiförmig, hochgewölbt, schwarz; jede Flügeldecke mit zwei gelben, unregelmäßig rundlich-dreieckigen Flecken, die nur ausnahmsweise durch einen gelben Strich miteinander verbunden sind (aberr. *vibex* Weise). Beim ♂ ist das fünfte Fühlerglied stark verlängert und verdickt. — Synonym: *brassicae* Illig., *quadripustulata* Payk. — Länge 1,5—1,8 mm.

deckenmitte am breitesten; die schmalste Stelle des schwarzen Nahtbandes liegt nicht, wie bei den meisten anderen gelbstreifigen Arten, nahe dem Flügeldeckenende, sondern nahe dem Schildchen. Zuweilen erweitert sich das schwarze Nahtband in der Mitte, fließt mit dem sich zuweilen gleichfalls erweiternden Seitensaum zusammen und bildet auf jeder Seite zwei ziemlich große, gelbe Makeln (aberr. *guttata* Weise). Die Art ist übrigens auch durch helle Extremitätenfärbung — die 4—5 ersten Fühlerglieder, die Schenkelspitzen und die ganzen Schienen der Vorder- und Mittelbeine sind meist hell rötlichgelb — sowie durch das beim ♂ sehr stark verlängerte und verdickte 5. Fühlerglied charakterisiert. — Länge: 1,6—2 mm.

Gemein im Mittelmeergebiete und dort wohl auch schädlich. Nach Foudras auf *Diploaxis*, nach St. Claire-Deville auf *Lepidium graminifolium*; jedenfalls auch auf anderen Cruciferen.

¹⁾ Ein Rufzeichen bezeichnet Eigenbeobachtung.

²⁾ Zur Beurteilung der Schulterbeule ist der Käfer von vorne zu betrachten, gegen das Licht gerichtet, das über seinen Rücken her einfällt (Fig. 3).

Im ganzen Gebiete, nicht häufig; an feuchten, quelligen Orten, von *Nasturtium* (Brunnenkresse) angegeben. Oftmals irrig unter dem Namen „*Haltica brassicae*“ als Kohlschädling zitiert.

Phyllotr. exclamationis Thunbg.

- 6 Der schwarze Nahtsaum der Flügeldecken ist vorne viel schmaler als in der Mitte, ist demnach vorne ebenso wie hinten etwas eingeschnürt verengt 7

- 6' Der sehr breite Nahtsaum der Flügeldecken ist vorne nur sehr wenig schmaler als in der Mitte, hinten nur schwach der Naht zugebogen, daher vorwiegend geradlinig, schwach nach vorne konvergent, begrenzt. Die Fühlerglieder 2—6 sind fast gleichlang, bei ♂ und ♀ gleich gestaltet, erstes Glied verdunkelt. Die gelbe Längsbinde der Flügeldecken ist nur selten in zwei Flecken geteilt. Die Art ist der *Phyll. tetrastigma* sehr ähnlich, doch etwas kleiner. — Synonym: *sinuata* Steph. nec auct. Länge 2—2,5 mm. — (Fig. 6.)

Im ganzen Gebiete, ziemlich selten; an feuchteren Orten. Kein Gartenschädling; die „*Haltica flexuosa*“ der Schädlingsliteratur ist durchwegs auf andere Arten, vielfach wohl auf *undulata* Kutsch., zu beziehen, zumeist aber überhaupt nicht sicher deutbar.

Phyllotr. flexuosa Illig.

- 7 Relativ sehr große Art (2,6—3 mm lang)¹⁾, mit gerundeten, hochgewölbten Flügeldecken; der breit lanzettliche Nahtsaum ist hinter der Mitte am breitesten. Die gelbe Längsbinde entweder zusammenhängend oder durch die hochbogenförmige Erweiterung des schwarzen Seitenrandes in zwei Flecken zerteilt (häufigere Normalform). Fühler wie bei der sehr ähnlichen vorgenannten Art in beiden Geschlechtern gleich; erstes Glied fast stets hell. — Länge 2,6—3 mm.

An feuchten, quelligen Orten, etwas häufiger als die vorige; auf *Cardamine amara* L. (dem bitteren Schaumkraut)!, durch Weise von *Nasturtium* (Brunnenkresse) angegeben.

Phyllotr. tetrastigma Com.

- 7' Kleinere Art (1,8—2 mm), mit minder gewölbten, seitlich wenig gerundeten Flügeldecken. Nahtzeichnung sehr charakteristisch: auf dem Rücken ein gemeinschaftliches, langes, schwarzes Rechteck mit etwas verrundeten Ecken, davor der Nahtstreif rasch auf die halbe Breite verengt (vgl. die Figur). Ausnahmsweise die gelbe Binde in zwei Flecken geteilt (aberr. *discedens* Weise); bei der aberr. *monticola* Weise ist die gelbe Binde dagegen sehr breit, wodurch die charakteristische Nahtzeichnung minder ausgeprägt wird. Beim ♂ ist das vierte Fühlerglied wenig, das fünfte stark verdickt; letzteres auch sehr verlängert. — Länge 1,8—2 mm. (Fig. 7.)

Im ganzen Gebiete; auch im größten Teile Asiens und in Nord-

¹⁾ Wenn kleiner, dann die vorgenannte Art in Betracht ziehen, die dieser oft sehr ähnlich wird.

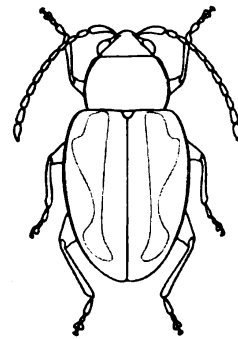


Fig. 6. *Phyllotr. flexuosa* Illig. ♂.

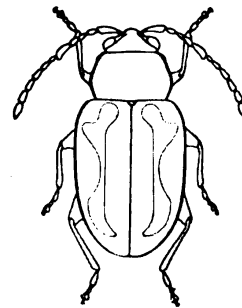


Fig. 7. *Phyllotr. vittata* Fab. (*sinuata* Redtb., nec Steph.) ♂.

amerika. Nicht selten, mehr an frischen Orten, doch nicht unbedingt feuchtigkeitfordernd. Von mir auf *Roripa silvestris* Bess. (Waldsumpfkresse), *Berteroa incana* D.C. und *Sinapis arvensis* L. (Ackersenf), auch an Kohl in Gärten unter *Phyll undulata* und *nemorum* eingestreut gefunden. Tritt aber mehr lokal auf und spielt gegen die beiden Genannten als Schädling eine viel geringere Rolle *Phyllotr. vittata* Fabr.

(*sinuata* Redtb. et auct., nec Steph.)¹⁾

- 8 Schienen pechschwarz, die Gelenke heller; Käfer klein bis mittelgroß (1,5—2,3 mm); Fühler in beiden Geschlechtern gleich 9
 8⁺ Schienen fast stets gelb; relativ große Art (2,5—3 mm). Fühlerglied 1—3 gelb, 1 selten verdüstert, 4—11 schwarz; Glied 4 und 5 beim ♂ mäßig verdickt. Das breite schwarze Nahtband vorn kaum verengt, bis nahe zum Ende fast parallel; Halsschild schwarz, meist bläulich oder grünlich schimmernd. — Länge 2,5—3 mm. — (Fig. 8.)

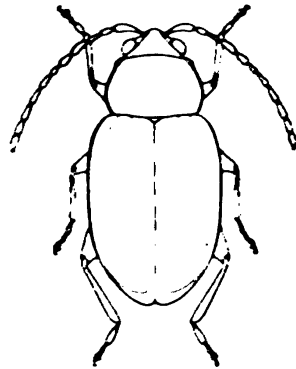


Fig. 8. *Phyllotreta nemorum* L.

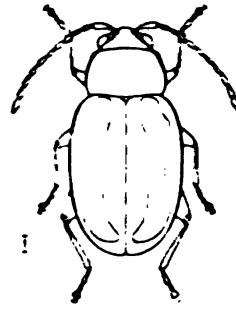


Fig. 9.
Phyllotreta undulata Kutsch. ♂.

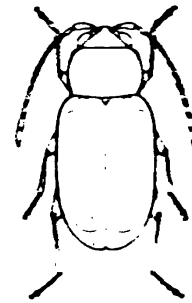


Fig. 10. *Phyllotreta vittula* Redtb. ♂.

Im ganzen Gebiete sehr häufig und schädlich, wenngleich minder als die folgende. Auf vielen wilden und kultivierten Cruciferen beobachtet. Ursprünglich war der Name *nemorum* der Inbegriff der gelbstreifigen Kohlerdföhe, und leider finden sich auch heute noch Phytopathologen, die ihn ohne Prüfung der Art in diesem Sinne gebrauchen: ein vom wissenschaftlichen Standpunkte aus nicht scharf genug zu rügender Vorgang *Phyllotr. nemorum* L.

- 9 Mittelgroße Art, etwa von der Größe der gemeinen einfarbig dunklen Arten (2—2,3 mm). Das schwarze Nahtband ist im vorderen Viertel ungefähr bis auf seine halbe Breite verengt; Halsschild schwarz ohne bläulichen oder grünlichen (zuweilen mit schwach erzbraunem) Schimmer. Bei der seltenen aberr. *bilineata* Weise ist die gelbe Binde sehr schmal, fast gleichbreit verlaufend und an der Basis der Naht weniger deutlich zugebogen. — Länge 2—2,3 mm. — (Fig. 9.)

Überall sehr gemein: die gemeinste gelbstreifige Art, wohl so ziemlich auf allen kultivierten und wilden Cruciferen. Auf diese Art beziehen sich wohl viele der älteren Angaben über *nemorum* und *flexuosa*.

Phyllotr. undulata Kutsch.

- 9⁺ Kleine Art, in der Regel kleiner als die einfarbig dunklen Arten (1,5 bis 1,8 mm), flach. Das schwarze Nahtband an der Basis nicht verengt.

¹⁾ Vgl. Verh. zool.-bot. Ges. Wien. Bd. 61. 1911. p. 11—16.

parallelseitig bis fast zur Spitze der Flügeldecken. Halsschild schwarz, meist mit metallgrünem Schimmer. — Länge 1,5—1,8 mm. — (Fig. 10.)

Im ganzen Gebiete sehr häufig; dennoch als Schädling weniger bemerkbar als die anderen Arten *Phyllotr. vittula* Redtb.

- 10 Kopf in seinem mittleren Teile, wenn auch sehr fein, so doch mit scharfer Lupe stets kenntlich punktiert. Hieher alle auf Cruciferen schädlichen Arten 11
- 10' Kopf in seinem mittleren Teile vollständig unpunktiert, höchstens unmittelbar neben den Augen mit 2—3 gröberen Punkten¹⁾. Nur zwei sehr flache, bronzefarbige, ziemlich große und langgestreckte Arten mit hinten breit und stumpf verrundeten Flügeldecken, die das Hinterleibsende nicht völlig bedecken. Die in Deutschland häufigere Art ist an dem auffällig stark plattenförmig erweiterten 4. Fühlergliede des ♂ leicht kenntlich. Beide Arten leben nur auf *Reseda*²⁾ 18
- 11 Das zweite und dritte Fühlerglied (zumindest auf der Unterseite) gelbrot 12
- 11' Alle Fühlerglieder völlig schwarz; der Kopf stets sehr fein punktiert, Flügeldecken fein und ganz verworren gedrängt punktiert, ohne Spuren einer Reihung einzelner Punkte 17
- 12 Fühlerglied 2—3 (zumindest zum Teile) rötlich oder rotgelb, Glied 1 zumeist, aber nicht immer, teilweise geschwärzt, Glied 4 meist ange-dunkelt; die Glieder 4 und 5 niemals auffällig verdickt und verlängert: 13
- 12' Fühlerglied 1—5 ganz rotgelb³⁾, Glied 5 länger als Glied 4, beim ♂ ver-dickt⁴⁾. (Diese Fühlerbildung des ♂ ist das Maßgebende, denn Stücke mit ganz hellen Grundgliedern der Fühler kommen ausnahmsweise auch bei *cruciferae*, *atra*, *diademata* und *aerea* vor.) Käfer schwarz, nicht merklich metallglänzend. — Synonym: *gallica* Bris. — Länge 1,6—2 mm.

Vielleicht in Westdeutschland, aber noch nicht sicher nachgewiesen; in Frankreich nach Bedel auf *Iberis amara* L.

Phyllotr. crassicornis All.

- 13 Käfer schwarz, höchstens kaum merklich metallisch angehaucht: 14
- 13' Blaugrün bis dunkel metallgrün; Kopf, Halsschild und Flügeldecken sehr kräftig punktiert, Punkte der letzteren auf dem Rücken hie und da etwas reihig gestellt. — Synonyme: *poeciloceras* Com., *obscura* Illig., *colorea* Foudr. — Länge 1,8—2,4 mm.

¹⁾ Einen unpunktierten Kopf besitzt übrigens auch die nicht eigentlich in diese Gruppe der Resedenbewohner zu stellende, der *Phyll. nigripes* in Habitus und Färbung äußerst ähnliche, jedoch größere, gewölbtere, weit stärker und rauher punktierte *Phyll. Ganglbaueri* Heiktr. [beschrieben in den Verhandl. d. zool.-botan. Gesellsch., Wien. Bd. 59. p. (290)—(292). 1909], die indessen für Mitteleuropa engeren Sinnes nicht in Betracht kommt, da sie zur Zeit nur aus Südungarn, Serbien, Herzego-wina, Triest, Görz und Krain bekannt ist.

²⁾ Außer diesen lebt auf *Reseda* noch das ihnen einigermaßen ähnliche Cruci-ferentier *Phyll. nigripes* (siehe 17').

³⁾ Zumindest vier helle Grundglieder der Fühler besitzt auch die der *Phyll. crassicornis* in Form und Färbung äußerst ähnliche und zuweilen wohl mit ihr verwechselte *Phyll. balcanica* Heiktr. [beschrieben in den Verhandl. d. zool.-bot. Ges. Wien. Bd. 59. 1909. p. (292)—(293)], bei der jedoch auch das ♂ einfache, nicht verdickte Fühler besitzt. Sie besetzt ungefähr das gleiche Gebiet wie die *Ganglbaueri*, ist demnach kein eigentlicher Mitteleuropäer.

⁴⁾ Das ♂ ist bei fast allen *Hallicinen* an dem stumpfer verrundeten, kürzeren Hinterleibsende und dem meist etwas erweiterten ersten Tarsenglied der Vorderbeine zu erkennen.

Im ganzen Gebiete häufig, stellenweise sehr schädlich.

Phyllotr. cruciferae Goeze

- 14 Flügeldecken mit deutlicher Schulterbeule¹⁾, die Hautflügel daher voll ausgebildet und die Tiere flugfähig; Halsschild schwach gewölbt, an den Hinterecken ziemlich verflacht, nach vorn schwach gerundet deutlich verengt. Häufigere Arten 15
- 14' Flügeldecken ohne oder mit sehr schwacher Schulterbeule, daher gerundeter, Hautflügel rudimentär, Tier flugunfähig. Halsschild groß, stark gewölbt, nach vorn kaum stärker als nach hinten gerundet verengt. Rein schwarz; der Kopf kräftig (vorwiegend auf einem Querstreifen über den Augen) punktiert; Flügeldecken kräftig und ganz regellos punktiert. — Länge 1,5—2,2 mm.

Äußerst seltene Art; nur in der Umgebung Wiens auf *Sisymbrium strictissimum* L. gefunden.

Phyllotr. austriaca Heiktr.²⁾

- 15 Kopf kräftig punktiert (Punkte zuweilen auf eine Querzone über den Augen beschränkt); Halsschild und Flügeldecken kräftig punktiert: 16
- 15' Kopf sehr zart (auf dem Scheitel ziemlich verloschen) punktiert; Halsschild fein, Flügeldecken fein, sehr dicht regellos punktiert. Kleiner und zarter als die übrigen schwarzen Arten, der Bronzeschimmer der schwarzen Oberseite meist deutlich. — Synonym: *punctulata* Foudr. — Länge: 1,6—2 mm.

Im Süden des Gebietes, nicht häufig; hie und da in Gesellschaft gemeiner Arten als Gartenschädling von mir beobachtet.

Phyllotr. aerea All.

- 16 Der ganze Kopf ziemlich kräftig, in der Mitte allerdings am stärksten, punktiert. Punkte der Flügeldecken auf dem Rücken, besonders in der Längsmittle der Decken, in deutliche, enge Längsreihen gestellt. Flügeldecken zumeist ganz rein schwarz, in den Schultern nur wenig breiter als der Halsschild. — Synonyme: *aterrima* Schrank, *melana* Illig. — Länge: 1,9—2,5 mm. — (Fig. 11.)

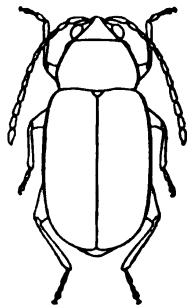


Fig. 11. *Phylloreta atra*
Fab. ♂.

Die gemeinste schwarze Art; neben *nigripes* und *undulata* vielleicht die gemeinste *Phylloreta* überhaupt, besonders an trockeneren Orten.

So ziemlich auf allen Crucifereu, daher sehr schädlich,

meist gemeinsam mit den eben Genannten. *Phyllotr. atra* Fabr.

- 16' Kopf nur auf einer Querzone zwischen den Augen (etwas oberhalb derselben) kräftig punktiert, vor und hinter dieser Querzone nicht punktiert. Punkte der Flügeldecken sehr undeutlich gereiht oder verworren. Die ganze Oberseite zumeist schwach metallisch angehaucht, die Flügeldecken in den Schultern beträchtlich breiter als der Halsschild. — Länge: 1,7—2,3 mm.

Wohl im ganzen Gebiete, aber nicht häufig und vorwiegend an feuchten Orten. Von mir in sumpfigen Auwiesen auf *Roripa silvestris* Bess. und *Neslia paniculata* Desv. gefangen. Kein Schädling *Phyllotr. diademata* Foudr.

¹⁾ Zur Beurteilung der Schulterbeule ist der Käfer von vorne (etwas seitlich) zu betrachten (Fig. 3).

²⁾ Beschrieben: Verh. zool.-bot. Ges. Wien. Bd. 59. 1909. p. (9)–(13).

- 17 Kopf sehr dicht fein punktiert. Tier mäßig gewölbt, bläulich- oder grünlichschwarz, ziemlich fein, aber nicht ganz so fein wie die folgende Art punktiert, die engen Zwischenräume der Punkte glänzend und nicht mattseidig chagriniert. Sicher an der Fühlerbildung kenntlich: beim ♂ Glied 3 trichterförmig, 4—5 zu einer auffälligen, gemeinsamen Walze verdickt; beim ♀ Glied 4 und 6 um die Hälfte kürzer als das ebenso dicke Glied 5. — Synonym: *melaena* Foudr. — Länge: 1,8—2,3 mm.

Nur westliches Deutschland: Baden, Elsaß, Rheinprovinz; nicht häufig. In Frankreich nach *Bedel* u. a. auch auf kultivierten Cruciferen.

Phyllotr. consobrina Curt.

- 17¹ Kopf sehr zerstreut, oft kaum sichtbar, punktiert. Tier auf dem Rücken abgeflacht, grünlichblau bis metallgrün, die ganze Oberseite infolge einer sehr feinen Grundchagriniierung matt seidig, Punktierung gedrängt und noch zarter als bei der vorgenannten Art, äußerst fein eingestochen. Fühlerglied 4, 5 und 6 untereinander bei beiden Geschlechtern ziemlich gleich lang¹). Diese Art, die auch auf *Reseda* vorkommt, wird in metallischen Stücken der folgenden oft ähnlich. — Länge: 2—2,6 mm. — (Fig. 12.)

Die gemeinste dunkle Erdflohart Mitteleuropas. Überall auf Kreuzblütlern, und zwar auf Unkraut, Küchengewächsen und Zierpflanzen, sowie auf *Reseda* gleich häufig. Einer der Hauptschädlinge.

Phyllotr. nigripes Fab. (*lepidii* Koch).

- 18 Fühlerglied 2 und 3 jedes ungefähr $1\frac{1}{2}$ mal so lang als breit, nie kugelig oder gar breiter als lang; Fühler in beiden Geschlechtern gleich, kein Glied auffällig verdickt. Halsschild merklich nach vorne verengt, ziemlich flach, seitlich im hinteren Teile viel schwächer abfallend als gegen Vorderecken; ebenso wie die Flügeldecken sehr fein und sehr gedrängt punktiert. Die ganze Oberseite gleichmäßig hell bronze- oder messingfarbig. Habituell der vorigen und der folgenden Art zuweilen ähnlich. Trochanteren (Anhangstücke am Schenkelgrunde) der Hinterbeine in Gestalt eines kleinen Zahnes vom Schenkel abstehend. — Länge: 2,2—2,6 mm.

Südliches Deutschland und Österreich; an trockeneren Orten auf *Reseda lutea* L. und *luteola* L. ziemlich selten. Nicht auf Cruciferen *Phyllotr. procera* Redtb.

- 18¹ Fühlerglied 2 und 3 meist bräunlichrot, beim ♀ ziemlich kugelig, nicht oder kaum länger als breit, Glied 4 wenig länger als 5, beide gleich dick; beim ♂ Glied 3 viel breiter als lang, kurz trichterförmig, Glied 4 zu einer sehr auffälligen, schon mit freiem Auge bemerkbaren, rundlichdreieckigen Platte erweitert, Glied 5 dick und kurz walzig. Halsschild von oben gesehen viereckig, hinten so breit wie vorne, nur wenig länger als breit, seitlich gegen die Hinterecken fast ebenso stark abfallend wie gegen die vorderen. Halsschild meist eine Spur flacher punktiert als die Flügeldecken, zuweilen auch in der Färbung von letzteren etwas abstechend (Kopf und Halsschild stets bronzig, die Flügeldecken oft düster grünlich); letztere stärker als bei der vorgenannten Art und eng verworren punktiert.

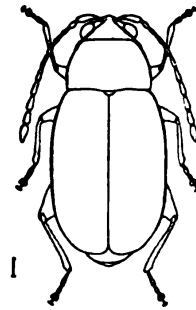


Fig. 12. *Phyllotreta nigripes* Fab.

¹) Das ♂ ist leicht kenntlich an dem ersten (schienennächsten) Glied der Vordertarsen, welches herzförmig, fast dreimal so breit als das kurze zweite, und breiter als das lappige dritte Glied ist.

Trochanteren der Hinterbeine ohne Spur eines abstehenden Zahns an den Schenkel angelegt verlaufend. — Synonym: *antennata* Koch. — Länge: 2,2—2,8 mm.

Nicht selten auf wilden Reseden im ganzen Gebiete. Kein Cruciferengast *Phyllotr. nodicornis* Marsh.

B. Gattung *Psylliodes* Latr.

- | | | |
|----|--|---|
| 1 | Halsschild oder Flügeldecken (oder beides) gelb oder rot gefärbt | 2 |
| 1' | Halsschild und Flügeldecken dunkelfarbig (blau, grün oder metallisch) | 7 |
| 2 | Flügeldecken gelb, zuweilen mit dunklem Nahtsaum (Arten als Schädlinge bedeutungslos) | 3 |
| 2' | Flügeldecken dunkelfarbig (blau, grün oder metallisch) | 6 |
| 3 | Flügeldecken gleichmäßig hellfarbig, die Naht niemals breit schwarz oder dunkelbraun gesäumt, die Spitze der Flügeldecken hell. Formen der Küstengebiete, für das mitteleuropäische Binnenland nicht in Betracht kommend | 4 |
| 3' | Flügeldecken mit stark angedunkeltem, mäßig breitem Nahtsaum, an der Spitze breit dunkel gefärbt | 5 |

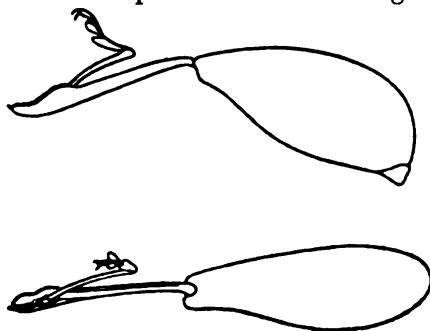


Fig. 13. Hinterbein einer Psylliodes.

- 4 Sehr großes Tier (3—4,5 mm lang); zumindest Mittel- und Hinterbrust, meist auch Bauch und Hinterschenkel schwärzlich. Halsschild auf sehr feinchagriniertem Grunde fein eingestochen punktiert; Halsschildseitenrand an der vorderen Borstenpore (ungefähr im ersten Drittel des Randes) nicht eckig nach außen tretend, sondern verrundet. Stirn mäßig fein, nach oben hin verlaufend punktiert. — (Fig. 14.)

- a) Halsschild gelb oder gelblichbraun **var. nucea** Ill.
b) Halsschild schwarz, oft metallgrün schimmernd
var. anglica Fab.

Im Gebiete der Meeresküsten Deutschlands, die erstgenannte Var.
speziell in Südeuropa; sicher auf Cruciferen.

Psylliodes chrysocephala L. var.

- 4* Etwas kleiner (2,8—3,6 mm lang); oben und unten einfarbig bräunlichgelb, Kopf und Halsschild zuweilen sehr schwach metallgrün überflogen; letzterer dicht und grob auf unebenem Untergrunde punktiert; Halsschildseitenrand an der vorderen Borstenpore stumpfeckig heraustretend. Stirn sehr eng und grob punktiert, die Punkte am Scheitel plötzlich erlöschend. — Synonym: *operosa* Foudr.

Küstengebiete, von der Ostsee bis Italien; nach Bedel auf dem Meersenf, *Cakile maritima* Scop.

Psylliodes marcida Ill.

- 5 Kleiner als die Vorgenannten (2,2—3 mm lang); Kopf sehr fein, Hals-
schild fein punktiert; ersterer meist, letzterer zuweilen pechbraun. Der
schwärzliche Nahtsaum der Flügeldecken verbreitert sich am Ende über
deren ganze Spitze.

Südeuropa bis Österreich, in Deutschland wohl nicht heimisch. Vielfach mit dem Solanaceengast *Psyll. affinis* Payk., einem ähnlich gefärbten, aber mit ganz unpunktiertem Kopf und heller Flügeldeckenspitze versehenen Kartoffelschädling verwechselt. In Italien von P. Bargagli auf *Armoracia rusticana* G. M. Sch. in Frankreich von J. St. Claire Deville auf *Bunias erucago* L. beobachtet. Kommt für Mitteleuropa nicht in Betracht.

Psylliodes circumdata W. Redtb.

- 6 Kopf und Halsschild rot, Flügeldecken blau bis metallgrün. — Länge: 2,8—3,6 mm.

Nicht häufig im deutschen Sprachgebiete; auf Unland an der feinflättrigen Rauke, *Sisymbrium sophia* L.! Nicht zu verwechseln mit der aus dem Mittelmeergebiete bekannten, auf deutschem Boden nicht vorkommenden gleichfarbigen *Psyll. chrysocephala* var. *collaris* Wse, von der sie durch die eckig vorspringende vordere Borstenpore des Halsschildes, durchschnittlich kleinere Gestalt, etwas dunklere Extremitätenfärbung usw. zu unterscheiden ist

Psylliodes cyanoptera Ill.

- 6' Halsschild und Flügeldecken dunkel.
7 Zumindest die vordere Kopfhälfte gelb oder rot 8
7' Der ganze Kopf gleichfarbig dunkel 9
8 Durchschnittlich größere Art (3—4,5 mm lang); Scheitel fast immer erzgrün angedunkelt; Halsschild und Flügeldecken ziemlich gleichfarbig dunkelblau bis grün; vordere Borstenpore (ungefähr im ersten Drittel des Halsschildseitenrandes) nicht eckig vortretend; Beine (mit Ausnahme der Hinterschenkel) fast stets hell rötlichgelb. — (Fig. 14.)

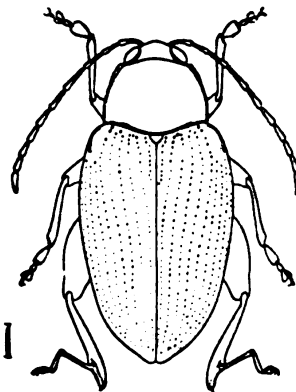


Fig. 14. *Psylliodes chrysocephala* L.

Die größte mitteleuropäische *Psylliodes*, leicht an dem hellen Vorderkopfe kenntlich. Nicht selten; Larve im Stengel, von Taschenberg als Rapsschädling gemeldet, von Carpenter in Kohl beobachtet. Schaden wohl nur in Ausnahmefällen bedeutender, in der Regel für Gemüse gering. *Psylliodes chrysocephala* L.

- 8' Durchschnittlich etwas kleiner (2,8—3,6 mm lang); Körperoberseite dreifarbig: Kopf gelbrot (Scheitel nicht erzgrün schimmernd), Halsschild schwarz, Flügeldecken blaugrün; vordere Borstenpore des Halsschildseitenrandes eckig vortretend; Beine meist gebräunt.

Unter der Normalform (siehe 6), aber seltener als diese. Kein Schädling *Psylliodes cyanoptera* aberr. *tricolor* Wse.

- 9 Hinterschenkel braunrot, auf dem Rücken dunkler¹⁾. Nur eine einzige aus deutschem Gebiete nicht sicher nachgewiesene, lang eiförmige Art: 10
9' Hinterschenkel schwarz, meist metallisch grün, blau oder kupferig überlaufen 11
10 Ziemlich groß, grünblau bis erzgrün, Punktstreifen der Flügeldecken kräftig, deren Zwischenräume sehr deutlich scharf punktulierte. Die Rinne, die unmittelbar am Innenrande des Auges läuft, ist durch die

¹⁾ Es kommen nur ausgefärbte Stücke in Betracht; bei unausgefärbten, unreifen Tieren jeder Käferart sind alle sonst dunklen Körperteile noch hell.

äußere Spitze der im übrigen undeutlichen Stirnhöcker unterbrochen (vgl. Fig. 18; sicherstes Kennzeichen der Art). — Synonym: *luteipes* Küst. — Länge: 3—3,8 mm.

Vielfach fehlbestimmte, in Mitteleuropa kaum heimische oder doch daselbst äußerst seltene Art der Mittelmeerländer.

Psylliodes fusiformis Ill.

- 11 Tier länglich eiförmig, mäßig gewölbt¹⁾ 12
 11' Tier kurz eiförmig, stark gewölbt; durchwegs sehr seltene Arten aus den Alpen und Karpathen, die als Schädlinge nicht in Betracht kommen 17
 12 Oberseite blau oder blaugrün; die ganzen Beine (mit Ausnahme der schwarzen Hinterschenkel) rotgelb 13
 12' Oberseite metallisch braun oder erzgrün; die Schenkel der Vorder- und Mittelbeine vielfach angedunkelt 14
 13 Länglich eiförmig bis eiförmig, Halsschild und Flügeldecken verhältnismäßig ziemlich stark gewölbt; an der Halsschildbasis jederseits ein kleines Punktgrübchen; Streifen der Flügeldecken aus großen, tiefen Punkten bestehend; die Punktulierung der Längszwischenräume zwischen den Streifen wenig ausgeprägt. Gewöhnlich dunkelblau, Halsschild zuweilen etwas grünlich. — Eine in den Alpen und Sudeten auf der ausdauernden Mondviole, *Lunaria rediviva* L., lebende Rasse ist größer,



Fig. 15. Kopf von *Psylliodes napi* Fab.

plumper, dunkel metallgrün, mit meist einfarbig hellen Fühlern (bei der Normalform ist die Außenhälfte der Fühler angedunkelt). — Synonyme: *rapae* Ill., *ecarata* Redtb. Länge: 2—3,3 mm. — (Fig. 15, Kopf.)

Im ganzen Gebiete, ziemlich häufig. Ist neben *Psyll. chrysocephala* L. — und vielleicht auch *cuprea* Koch — wohl die einzige *Psylliodes*, die in Mitteleuropa für eine Schädigung kreuzblütiger Kulturgewächse in Betracht kommen könnte.

Bevorzugt feuchtere Orte, wo sie auf Arten der Cruciferengattungen *Nasturtium*, *Cardamine* und *Alliaria* (!) gefunden wurde; auch von Gemüse ist sie gemeldet. Fehlt an trockeneren Orten *Psylliodes napi* Fab.

- 13' Sehr lang eiförmig, Halsschild und Flügeldecken nur flach gewölbt; die Halsschildbasis jederseits ohne deutliches Punktgrübchen; Streifen der Flügeldecken aus mäßig feinen, eng stehenden Punkten gebildet (die Abstände der hintereinanderstehenden Punkte meist nicht breiter als die Punkte selbst). — Länge: 2,6—3,8 mm.

Selten; auf dem Färberwaid, *Isatis tinctoria* L. (!) beobachtet. Wurde vielfach mit der aus Frankreich beschriebenen *Psyll. thlaspis* Foudr. verwechselt. (Da mir letztere vorläufig nicht ganz sicher gedeutet, zumindest aus deutschem Gebiete nicht einwand-

¹⁾ Der nun folgende Teil der Tabelle ist nach Gesichtspunkten angelegt, die streng systematischen Anforderungen wohl nicht ganz gerecht werden, dafür aber den Vorzug haben, von dem nicht speziellen Fachmann leichter beurteilt werden zu können und ihn vielleicht besser zu orientieren, als eine auf systematischer Höhe stehende Tabelle, vor der er oft schon bei den ersten Merkmalen, wenn sie schlecht kenntlich oder schwer beurteilbar sind, völlig ratlos steht und auch keine beiläufige Orientierung erwirbt. Im übrigen möchte ich ausdrücklich erwähnen, daß gerade dieser Teil der Gattung *Psylliodes* hinsichtlich sicherer Determination auch dem Kenner vielfach Schwierigkeiten bereitet und daß vor jeder Publikation über ein solches Tier unbedingt die Meinung eines Spezialisten eingeholt werden muß.

frei nachgewiesen erscheint, habe ich sie in diese Tabelle nicht aufgenommen.) Habituell sehr ähnlich kann werden die aus deutschem Gebiete nur von wenigen südlichen Punkten nachgewiesene *Psyll. fusiformis* (vgl. 10, Fig. 16 und 18).

Psylliodes cuprea var. nov. *isatidis* Hktgr.

- 14 Vorder- und Mittelbeine rötlichgelb, höchstens die Basalhälfte an deren Schenkeln, nicht aber die Schienen, gebräunt; verhältnismäßig etwas größere, länglich und flacher gebaute Arten 15
- 14' Vorder- und Mittelschenkel mit Ausnahme der Spitze dunkel, die Schienen (bei reifen Stücken) zumindest leicht gebräunt; etwas kleinere, kürzere, gewölbte Arten 16
- 15 Erz- oder kupferfarben, seltener erzgrün bis blaugrün, infolge äußerst feiner Grundchagrinerung der Oberseite matt seidenglänzend; Tier meist sehr lang eiförmig, Halsschild und Flügeldecken schwach gewölbt; ersterer fein (normal) oder mäßig stark punktiert (Form *obscura* Duft., *herbacea* Foudr.); Streifen der Flügeldecken aus feinen, eng stehenden Punkten gebildet, die Längszwischenräume zwischen den Streifen sehr eben, mindestens viermal so breit als ein Punkt, sehr fein punktulierte. Die Rinne neben dem Innenrande des Auges läuft ununterbrochen und gleich breit bis zur Fühlerbasis herunter (vgl. Fig. 16; wichtiges Unterscheidungsmerkmal von der folgenden Art). — Synonyme: *Foudrasi* Bach, *cupronitens* All. — Länge: 2,5—3,2 mm.

Im ganzen Gebiete, nicht gerade selten. Von Czwalina und Bedel auf *Sisymbrium officinale* Scop. gefunden. Könnte ausnahmsweise als Gartenschädling auftreten. Von erzgrünen Formen der *Psyll. napi* (siehe 13) ist das Tier durch schlankere, flachere Gestalt, öfters an der Basis angedunkelte Vorder- und Mittelschenkel, besonders aber durch die feinen, gedrängt stehenden Punkte der Flügeldeckenstreifen und die sehr breiten, ebenen, äußerst fein aber gut kenntlich punktulierten Zwischenstreifen zu unterscheiden

Psylliodes cuprea Koch

- 15' Glänzend erz- oder kupferfarben; Tier durchschnittlich ein wenig kürzer als die vorgenannte Art gebaut und ein wenig gewölbter als diese; Punkte der Flügeldeckenstreifen mäßig stark (etwas stärker als bei *Psyll. cuprea*), wie bei dieser mit breiten, ebenen Längszwischenräumen, die aber viel schärfer und sehr deutlich punktulierte sind. Die Rinne neben dem Innenrande jedes Auges wird durch die feine Spitze der (im übrigen undeutlichen) Stirnhöcker, die in dieselbe mündet und darin ein kleines Stück emporläuft, gerade über der Fühlergrube auf die halbe Breite eingengt (Fig. 17), aber nicht wie bei *Psyll. fusiformis* (vgl. 10 und Fig. 18) ganz unterbrochen. — Länge: 2,3—3,3 mm.

Südeuropa; nur in südlicheren und mittleren deutschsprachigen Gebieten und da äußerst selten. Standpflanze unbekannt; dürfte aber wohl eine Crucifere sein *Psylliodes pyritosa* Kutsch.

- 16 Lebhaft glänzend dunkel kupferig; Punktierung der Oberseite schärfer als bei den folgenden Arten, auf Stirn und Halsschild kräftig; Punkte der Flügeldeckenstreifen stark, die Längszwischenräume daher wenig breit, sehr glänzend, sehr deutlich punktulierte. Die Rinne neben dem Innenrande jedes Auges läuft ununterbrochen und gleichbreit bis in die Grube

an der Fühlerwurzel (Fig. 16); Stirn vorne zwischen den Augen mit den Spuren eines \times förmigen Eindruckes; Schulterbeule kräftig; Außenrand der Hinterschienen basalwärts von der Einlenkungsstelle der Fußglieder mit mehreren kräftigen Zähnen, die weit deutlicher sind als bei irgend-einer der verwandten Arten und die bei Ansicht von oben her am besten wahrgenommen werden. — Länge: 2,2—2,6 mm.

Recht selten; im südlicheren deutschen Sprachgebiete. Sicher auf Cruciferen (von mir unter andern auf *Berteroa incana* D. C. und *Erucastum Pollichii* Schimp. gefunden), von Kutschera nahe bei Küchengärten gesammelt; doch viel zu selten, um als Schädling zu gelten. *Psylliodes cupreata* Duft.

- 16' Dunkel grünlich oder schwärzlich mit Erzschimmer, mäßig glänzend; Stirn schwach und zerstreut, Halsschild schwach und seicht punktiert; Punkte der Flügeldeckenstreifen mäßig stark, Längszwischenräume fein



Fig. 16.
Augenrinne
bei *Psylli-
odes cuprea*.
Koch



Fig. 17. Augen-
rinne bei
*Psylliodes
instabilis*
Foudr.

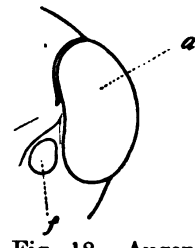


Fig. 18. Augen-
rinne bei
*Psylliodes
fusiformis* Ill.
(a Auge, f Fühler-
gelenkspfanne).

chagriniert, verloschen punktuell. Die Rinne am Innenrande jedes Auges ist wie bei *Psyll. pyritosa* durch die Spitze der (verloschenen) Stirnhöcker eingengt (vgl. 15' und Fig. 17); Stirn höchstens mit einem undeutlichen Grübchen; Schulterbeule der Flügeldecken nur schwach längswulstig ausgebildet; Außenrand der Hinterschienen basalwärts vom Tarsengelenk ohne mehrere deutliche Zähne. — Länge: 1,8—2,8 mm.

Ziemlich selten; an trockeneren, steinigen Orten, von Foudras und Bedel auf *Iberis*, von Kutschera auf *Erysimum cheiranthus* Pers., von mir auf *Erysimum strictum* G. M. Sch. gefunden. — Dieser Art sehr ähnlich wird die aus deutschem Gebiete noch nicht sicher nachgewiesene geflügelte Form der *Psyll. aerea* Foudr., die aber deutliche, schmal querstehende und von deutlichen Furchen begrenzte Höckerchen vorn an der Stirn zeigt. Auch den drei folgenden *Psylliodes* wird *instabilis* habituell oft ziemlich ähnlich, ist aber von ihnen durch die Bildung der Augenrinne sicher zu unterscheiden. *Psylliodes instabilis* Foudr.

- 17 Die ganzen Fühler und die Vorder- und Mittelbeine mit Ausnahme der pechbraunen Schenkel hell rotgelb¹⁾ 18

¹⁾ Hierher zu vergleichen ungeflügelte Formen der *Psyll. napi* (vgl. 13), die aber zumeist ganz helle Vorder- und Mittelschenkel, meist dunkle Außenhälfte der Fühler usw., besitzen.

- 17' Die Fühler in der Außenhälfte schwärzlich, bei reifen Tieren die Schienen gebräunt¹⁾ 19
- 18 Etwas größere Art, schwarz mit bläulichem oder düster metallgrünem Schimmer. Vorne an der Stirn zwischen den Augen keine deutlichen Höckerchen oder Querlinien. — Länge: 2,4—3 mm.
Ostalpen, Siebenbürgen; sehr selten. Standpflanze unbekannt, doch wahrscheinlich eine Crucifere. Das Tier wird manchen Formen der *Psyll. napi* (vgl. 13) sehr ähnlich.
Psylliodes subaenea Kutsch.
- 19 Mittelgroße Art, dunkelblau oder grünlich; Längszwischenräume der Flügeldeckenstreifen sehr deutlich punktiert. Stirnlinien und Stirnhöcker (zwischen den Augen) wenig deutlich. — Länge: 2,2—2,5 mm.
Ostalpen; äußerst selten. Standpflanze nicht bekannt, nach *Kutschera* eine Crucifere *Psylliodes picipes* Redtb.²⁾.
- 19' Kleinere Art, dunkel bronzeglänzend oder schwärzlich metallisch; Halsschild und Längszwischenräume der Flügeldeckenstreifen kaum sichtbar punktuell³⁾. Vorne zwischen den Augen zwei schmale, querstehende Höckerchen, die oben und unten von je einer deutlichen Furche begrenzt und voneinander durch ein kleines Grübchen getrennt sind. — Länge: 1,6—2,4 mm.
Äußerst selten; im deutschen Sprachgebiete nur in der ungeflügelten Form⁴⁾ in der Wiener Gegend gefangen. Als Standpflanzen stellte ich fest *Thlaspi montanum* L. und *Arabis turrita* L.
Psylliodes aerea var. *austriaca* Hktgr.

Neue Literatur,

zusammengestellt von

Prof. Dr. OTTO HAMANN,

Oberbibliothekar der Kgl. Bibliothek in Berlin.

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zur unbelebten Natur.

Luft, Wasser, Boden.

Weichardt, W., und Kelber, C., Über Luftuntersuchungen. (München. med. Wochenschr. Jg. 59. 1912. No. 35. p. 1889—1891. 2 Fig.)

Nahrungsmittel im allgemeinen.

Antonowsky, A. J., Zur Frage der Desinfektion von Trinkwasser mittels minimaler Chlorkalkmengen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 72. 1912. Heft 3. p. 421—444.)

Roux, E., Stérilisation des eaux de source par un procédé de fortune. (Rev. d'hyg. et de police Sanit. T. 34. 1912. Heft 7. p. 749—753.)

Wein, Weinbereitung.

Brunet, Raymond, Le cuveau des mouts rouges. (Ann. de viticult. Année 19. 1912. No. 977. p. 268—273.)

¹⁾ Hierher zu vergleichen die oft sehr kurz gebaute *Psyll. instabilis* (vgl. 16'), die an der Bildung der Augenrinne sicher zu erkennen ist, im übrigen aber der *Psyll. aerea* oft äußerst ähnlich wird. Sie besitzt keine deutlichen Stirnhöcker.

²⁾ Artcharakteristik nach *Redtenbacher* und *Kutschera*.

³⁾ Die in Gestalt, Größe und Färbung oft ähnliche *Psyll. cupreata* (vgl. 16) besitzt sehr deutlich punktuellte Zwischenräume der Flügeldecken, stark punktierten Kopf und Halsschild, über den Höckern schlecht ausgeprägte Stirnlinien, eine deutliche Schulterbeule der Flügeldecken, usw.

⁴⁾ Beschrieben: *Verhandl. d. zool. botan. Gesellsch. Wien*. Bd. 61. 1911. p. (21)—(22).

Fleisch.

Fichtenthal, Hugo, Beiträge zur Fleischkonservierung. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Jg. 22. 1912. Heft 11; Heft 12. p. 376—831.)

Milch, Molkerei.

Barthel, Chr., und **Orla, Jensen**, Über internationale Methoden zur Beurteilung der Milch. (Milchwirtsch. Centralbl. 1912. Heft 14. p. 417—428.)

Buttenberg, P., **O. Penndorf**, und **K. Pfizenmaier**, Untersuchungen über Käse des Handels. (Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel. 1912. Bd. 23. Heft 12. p. 669—676.)

Fodor, Koloman, v., Über Liptauer Käse. (Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel. 1912. Bd. 23. Heft 12. p. 662—668.)

Kürsteiner, J., Zur Frage der Behandlung und Verwendung des Käsereisauers. (Molkerei-Ztg. (Berlin) 1912. Nr. 26. p. 302—303.)

Rühmekorf, Zur Milchkontrolle in Leipzig. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1912. Heft 11. p. 352—356.)

Schrakamp, Erkrankungen nach dem Genuß von Milch. (Milchwirtsch. Centralbl. 1912. Heft 13. p. 385—394.)

Bier, Bierbereitung.

Bleisch, C., und **Wenzel, W.**, Über das Verhalten von Kalk, Magnesia, Schwefel- und Phosphorsäure während des Sud- und Gärprozesses unter Berücksichtigung verschiedener harter Wasser. (Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. N. F. Jg. 35. 1912. No. 39. p. 445—450.)

Andere Nahrungsmittel.

Miramond de Laroquette, Rapport sur les altérations et conservation des oeuf. (Compt. rend. Assoc. franç. pour l'avanc. d. sc. 40. Sess. Dijon 1911. p. 1180—1185.)

Wohnungen, Abfallstoffe, Desinfektion usw.

Bauer, Johann, Versuche mit Desinfektionsmitteln in der Kellerwirtschaft. (Allg. Wein-Ztg. Jg. 29. 1912. No. 34. p. 385—386.)

Fuller, George W., Sewage disposal. New York 1912. 767 p. 8°. 24 A

Hauptner, R., Die Konstruktion der Absatzbecken. Ein Überblick über 30 Jahre Abwasserreinigung. (Gesundheits-Ingenieur. Jg. 35. 1912. No. 24. p. 499—511. 95 Fig.)

Purvis, G. Carrington, A new method of demonstrating the presence of *Bacillus coli* in sewage-polluted water. (Lancet 1912. Vol. 2. N. F. p. 438—439.)

Rohland, Zur Abwasserfrage im neuen preußischen Wassergesetzentwurf. (Techn. Gemeindebl. Jg. 15. 1912. No. 6. p. 82—83.)

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Bachmann, Fritz, Beitrag zur Kenntnis obligat anaerober Bakterien, p. 1.

Buromsky, J., Die Salze Zn, Mg und Ca, K und Na und ihr Einfluß auf die Entwicklung von *Aspergillus niger*, p. 54.

von Faber, F. C., *Spirillum bataviae*, p. 41.

von Feilitzen, Hjalmar, Beiträge zur Kenntnis der niederen pflanzlichen Organismen, besonders der Bakterien, von Hoch- und Niedermoores in floristischer, morphologischer und physiologischer Beziehung von Dr. Georg Albert Ritter, p. 53.

Gorini, Costantino, Studien über die rationelle Herstellung des Parmesan- (Grana-) Käses, p. 42.

Heikertinger, Franz, Die einheimischen Kohlerdlöhe, p. 98.

Müller, Karl, Zur Biologie der Schwarzfleckenkrankheit der Ahornbäume, hervorgerufen durch den Pilz *Rhytisma acerum*, p. 67.

Neue Literatur. p. 127.

Abgeschlossen am 23. November 1912.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

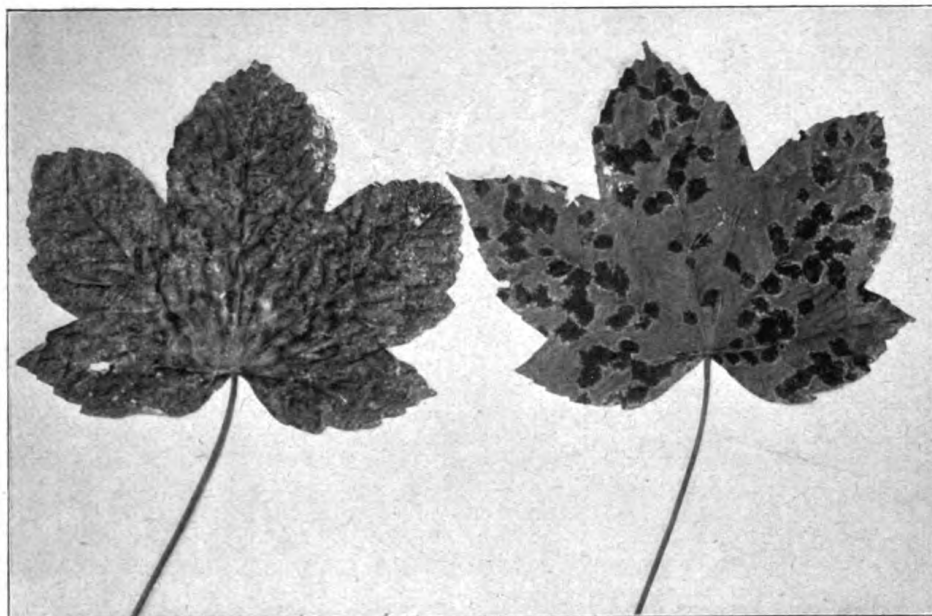


Fig. 1.



Fig. 2.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena**.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 36. No. 6/14.

Ausgegeben am 28. Dezember 1912.

Nachdruck verboten.

Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen.

Von Prof. Dr. Müller-Thurgau, Direktor, und Dr. A. Osterwalder, Adjunkt
der
Schweiz. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil.
Mit 3 Tafeln.

Einleitung.

Auch heute noch gehen alljährlich große Werte durch Verderben von Weinen und Obstweinen verloren. Zwar hat schon P a s t e u r auf Organismen als Ursache dieser Krankheiten hingewiesen; allein trotzdem und trotz der Vervollkommnung der bakteriologischen Untersuchungsmethoden ist man bis heute noch nicht so weit, die im Wein vorkommenden Bakterien in morphologischer und physiologischer Hinsicht gründlich zu kennen und gestützt hierauf die Weinkrankheiten zu verhindern. Der geringen Kenntnis der Weinbakterien entspricht es denn auch, wenn sie in zusammenfassenden bakteriologischen Werken kaum Erwähnung finden. Mit Rücksicht auf die hohe praktische Bedeutung versucht man gewöhnlich zu früh praktischen Zielen zuzustreben, und auf empirischem Wege statt auf Grundlage genauer Bakterienkenntnis die gefundenen Organismen zu bekämpfen oder damit die Krankheiten künstlich zu erzeugen. Von der Erwägung ausgehend, daß es in erster Linie notwendig ist, die in kranken Weinen auftretenden Organismen im morphologischen, namentlich aber in ihrem physiologischen Verhalten gründlich zu erforschen, und daß man gestützt auf die so gewonnenen Ergebnisse sicherer dazu gelangen wird, das Wesen der Weinkrankheiten zu verstehen und dann auch die praktischen Ziele zu erreichen, haben wir die vorliegende Arbeit durchgeführt als Beitrag zur Lösung dieser Aufgaben.

Kapitel I.

Die bisherigen Kenntnisse von den durch Bakterien im Wein verursachten Veränderungen.

Noch sind kaum 50 Jahre verstrichen, seit über die Ursache der Weinkrankheiten Ansichten bestanden, die wir heute kaum mehr verstehen können. Man hielt die Weinkrankheiten, die damals jedenfalls noch häufiger auftraten als heute, für Störungen im Gleichgewicht der chemischen Substanzen. Der Wein wurde als eine Flüssigkeit betrachtet, deren verschiedene Stoffe fortwährend, wenn auch langsam, auf einander einwirken; er wäre demnach immer in Umsetzungen begriffen, würde stets „arbeiten“. Mit der alkoholischen Gärung sei kein Gleichgewichtszustand zwischen den verschiedenen Stoffen erreicht; es brauche Zeit, bis die einen sich mit den anderen vereinigen. Wenn diese gegenseitigen Einwirkungen in ihrem Verlauf gestört würden, so werde der Wein krank. Ende des 18. Jahrhunderts stellte F a b r o n i

eine Theorie der Weinkrankheiten und der Gärung auf, die hier erwähnt zu werden verdient. Nach P a s t e u r (1, p. 5) hat F a b r o n i zum ersten Male erkannt, daß das gärende Prinzip eiweißartiger Natur ist („gluten“). Wenn bei der Alkoholgärung Zucker und diese eiweißartigen Verbindungen („principe végétal-animal“, „gluten“) sich in geeignetem Verhältnis vorfinden, werden sie nach F a b r o n i beide vollständig zersetzt und es enthält der Wein nachher keinen der beiden Stoffe. In diesem Falle ist eine Krankheit nicht zu befürchten, da im Wein der Keim der Zersetzung sich nicht findet. Überwiegt aber der Zucker gegenüber dem „principe végétal-animal“, d. h. gegenüber dem „gluten“, so bleibt der Zucker unvergoren, der Wein süß, aber gesund. Wenn das „gluten“ gegenüber dem Zucker hingegen vorherrsche, dann genüge ein Teil desselben, um allen Zucker zu zersetzen und was übrig bleibe, erzeuge fast alle Krankheiten des Weines. Bleiben die Eiweißsubstanzen gelöst, so können sie das Stichtigwerden („dégénération acide“) herbeiführen. Werden dagegen diese Stoffe ausgeschieden, so erzeugen sie das Schleimigwerden, Zähwerden des Weines.

Berücksichtigt man, daß solche Ansichten bis zu P a s t e u r allgemein gültig waren, so tritt recht deutlich das große Verdienst dieses Forschers hervor, der durch sein Werk „Etudes sur le vin“ die Vorstellung vom Wesen der Weinkrankheiten auf einen neuen und zwar den richtigen Boden stellte. Er zeigte in einer für die damalige Zeit unübertrefflichen Weise, daß die Krankheiten der Weine mit dem Vorhandensein von Organismen und zwar von Bakterien zusammenhängen; insbesondere wies er dies nach beim Essigstich, beim Umschlagen des Weines (tourne, pousse), Zähwerden und bei der Bitterkrankheit. Durch diese klassische Arbeit war nun Bahn gebrochen, so daß von da an in Arbeiten über Weinkrankheiten diese als durch Organismen, meist Bakterien, verursacht dargestellt wurden. Wenn auch früheren Arbeiten, wie auch jenen von P a s t e u r entgegengehalten werden muß, daß der Zusammenhang der Krankheit mit den gefundenen Bakterien nicht wirklich nachgewiesen wurde, was ja nach dem damaligen Standpunkt der Untersuchungsmethoden und Züchtung von Bakterien noch nicht möglich war, so haben die späteren Forschungen doch gezeigt, daß die Ansichten P a s t e u r s im allgemeinen der Wirklichkeit entsprachen. Immer mehr mußte sich jedoch der Gedanke in den Vordergrund drängen, daß exakte Beweise erforderlich seien und daß solche nur gewonnen werden können, indem man die betreffenden Bakterien isoliert, reinzüchtet, in ihrem physiologischen Verhalten genau prüft und gesunde Weine damit infiziert.

Trotzdem die Methode der Bakterien-Reinkultur durch Rob. K o c h schon anfangs der achtziger Jahre bekannt gegeben worden war, ließen weitere Fortschritte auf dem Gebiete der Weinbakteriologie längere Zeit auf sich warten, bis dann in den neunziger Jahren namentlich in Frankreich, wo der geringe Säuregehalt der Weine das Auftreten von Krankheiten wesentlich begünstigt, mehrere tüchtige Arbeiten erschienen. Trotzdem ist man noch weit entfernt von einer tieferen Einsicht in die Ursachen aller wichtigeren Weinkrankheiten und es bedarf noch vieler methodischer Arbeit auf diesem Gebiete. Bis jetzt sind nur einzelne Bakterien, die in Betracht kommen, reingezüchtet und studiert worden und der unerläßlichen, allerdings auch hier schwierig zu erfüllenden Anforderung, daß durch eine Reinkultur von solchen eine Krankheit müsse hervorgerufen werden können, wurde nur in einigen wenigen Fällen Genüge geleistet.

1. Das Vorkommen von Bakterien im Wein.

Schon auf den Trauben und am Obst finden sich nachgewiesenermaßen Bakterien verschiedener Art oft in großer Menge, was sich teils direkt beobachten läßt, namentlich aber auffällt, wenn man frisch bereiteten Trauben- und Obstsaft zur Herstellung von Plattenkulturen benützt. Von all diesen Bakterien tritt jedoch kurze Zeit nach der üblichen Verarbeitung der Früchte zur Weinbereitung schon bald ein großer Teil zurück, alle diejenigen, die nicht in saurer Flüssigkeit weiter leben können. Je nach dem Säuregehalt des Saftes wird also die Zahl der weiter sich vermehrenden Bakterienarten mehr oder weniger eingeschränkt und in ganz sauren Traubensäften findet schon in den ersten Tagen nach der Kelterung überhaupt kein Bakterienwachstum (bei normaler Kellerbehandlung) mehr statt. In milden Weinen werden andererseits, wie wir durch öftere Beobachtungen direkt nachgewiesen haben, gewisse von den Früchten herrührende Bakterien erhalten bleiben und später Krankheiten verursachen können. Vielfach wird aber der Ursprung der einen Wein krank machenden Bakterien ein anderer sein, indem bei der Kellerbehandlung nur zu leicht die betreffenden Bakterien von einem Wein in den anderen übertragen werden, sei es durch die verwendeten Geräte (Fässer, Weinpumpen, Schläuche usw.) oder aber durch Zusätze von Wein (Füllwein, Koupierwein).

Dementsprechend können die Krankheiten verursachenden Bakterien in verschiedenen Entwicklungsstadien des Weines vorhanden sein.

Daß schon während der Gärung Bakterien im Wein sich stark vermehren und tiefgreifende Umsetzungen hervorrufen können, hat schon P a s t e u r dargetan und spätere Untersuchungen z. B. über Mannitgärung, haben bewiesen, daß solche Vorgänge bei milden Weinen, namentlich, wenn sie durch hohe Temperatur gefährdet werden, sehr häufige Erscheinungen sind. Bei Obstweinen, zumal bei milden Birnweinen, treten nach den jahrelang von uns durchgeführten Untersuchungen die sogenannten Milchsäurebakterien schon während der Hauptgärung in großer Zahl auf, so daß neben der alkoholischen Gärung gleichzeitig eine Milchsäure- oder Mannitgärung verläuft. Auch den Bakterien, die das Zäherwerden der Weine verursachen, begegnen wir nicht selten schon während der Gärung. In den meisten Fällen allerdings machen sich die Bakterien des Milchsäurestiches erst nach Abschluß der Hauptgärung bemerkbar. Die die bekannte Säureabnahme der Weine verursachenden Bakterien treten, wie schon die periodischen Säurebestimmungen erkennen lassen, meist schon bald nach Abschluß der Gärung auf; direkte Beobachtungen von S e i f e r t und uns ließen eine rasche Vermehrung dieser Bakterien zu dieser Zeit erkennen. Bei verschiedenen Bakterien wird ohne Zweifel die im Frühling sich einstellende Temperaturerhöhung in den Kellern den maßgebenden Einfluß auf ihre Überhandnahme ausüben, so daß sie erst jetzt zur starken Entwicklung gelangen und die charakteristischen Veränderungen verursachen, wie z. B. das Lindwerden des Weines und das eigentliche Umschlagen (*tourne, pousse*). Unzweifelhaft können Bakterien unter Umständen auch erst im späteren Entwicklungsstadium der Weine sich so vermehren, daß sie bemerkbar werden, sei es, daß sie Trübungen oder chemische Veränderungen des Weines hervorrufen, wie dies z. B. von den Bakterien bekannt ist, denen das Bitterwerden der Rotweine zugeschrieben wird und wie dies auch in verschiedenen Fällen bei der Krankheit des Umschlagens (*tourne, pousse*) beobachtet wird. Es wäre gewiß eine dankbare

9*

Aufgabe, das Auftreten der Krankheitsfermente in den aufeinanderfolgenden Stadien der Gärung und Weiterentwicklung des Weines genauer zu verfolgen und festzustellen, inwieweit die oft plötzliche stärkere Vermehrung der Bakterien zu einer bestimmten Zeit abhängig ist von den Wärmeverhältnissen, von der alkoholischen Gärung, der Anwesenheit des Hefetrubes, dem Säureabbau, dem allmählich möglich werdenden Zutritt von Luft und andererseits dem Luftabschluß, sowie von den während des Ausbaues weiteren chemischen Veränderungen.

Der äußeren Form nach finden sich in den Weinen und zwar in gesunden und kranken, verschiedene Bakterien. Festgestellt wurde das Vorkommen von Vertretern von Bacteriaceen und Coccaceen, erstere in Form von kürzeren und längeren Stäbchen, einzeln oder in Fäden zusammenhängend, letztere als perlschnurartige Verbände (Streptokokken) oder als vereinzelte Kokken, Diplokokken und Pediokokken (Tetraden). Dabei treten die Bacteriaceen am häufigsten auf. Bewegliche Bakterien konnten wir ausnahmsweise in unvergorenen Säften, nicht aber in vergorenen Weinen oder Obstweinen beobachten. Auch von anderer Seite sind selbst in kranken Weinen, soweit solche sich nicht in vollständig fauliger Zersetzung befanden, keine beweglichen Bakterien beobachtet worden. Hiermit scheinen die Angaben von E. K r a m e r (1; p. 135) in Widerspruch zu stehen, der aus umgeschlagenen Weinen aus Kroatien und Steiermark eine Reihe von Bakterien mit Eigenbewegung herausgezüchtet hat. Allein man gewinnt den Eindruck, daß es sich dabei um stark faulig zersetzte Weine handelte, die also eigentlich nicht mehr Weine waren. Auch sporenbildende Bakterien sind offenbar im Wein sehr selten. E. K r a m e r (1; p. 137) berichtet von solchen bei den soeben erwähnten umgeschlagenen Weinen; ebenso führt W o r t m a n n an (4; p. 657), daß in einem bitteren Landwein aus Tirol Stäbchen mit Endosporen vorhanden waren. In der ausgedehnten französischen Literatur erwähnen nur B o r d a s, J o u l i n und d e R a c z k o w s k i (1—3) Sporen und Geißeln bei Organismen, die sie aus bitteren und umgeschlagenen Weinen züchteten. Wir fanden in Weinen niemals solche, dagegen stellten sich in einem Obstwein aus Reinholzbirnen auf dem Trub Bakterienblasen ein, die zu Fäden verbundene Bakterien mit Endosporen enthielten; der Charakter letzterer wurde in diesem Falle durch Färbung unzweifelhaft festgestellt (Müller-Thurgau 6; p. 397).

2. Die durch diese Bakterien verursachten Veränderungen.

Es dürfte zweckmäßig sein, sich über die Definition des Begriffes Weinkrankheit zunächst auszusprechen. Schon jetzt hat man sich darin geeinigt, daß nur solche Veränderungen als Weinkrankheit betrachtet werden können, die durch im Wein lebende Organismen verursacht werden. Dagegen wäre es nicht richtig, jede durch Organismen herbeigeführte Veränderung als Krankheit aufzufassen. Zunächst ist selbstverständlich die normale Gärung auszunehmen, sodann würden wir auch den Säureabbau, soweit dabei nicht ungünstig wirkende Nebenprodukte entstehen, nicht als Krankheit betrachten. Man käme so etwa zu folgender Definition: Unter Weinkrankheit sind jene fortschreitenden Veränderungen zu verstehen, die durch im Saft oder Weine lebende Organismen (Schimmelpilze, Sproßpilze und Bakterien) verursacht werden und bei denen

Produkte entstehen, die die Beschaffenheit des Weines hinsichtlich Geruch, Geschmack oder Bekömmlichkeit ungünstig beeinflussen. Dem bisherigen Gebrauch entsprechend, würden wir Fehler im Geruch, Geschmack und Farbe, die nicht auf direkte Wirkung von im Weine lebenden Organismen zurückgeführt werden können, als Fehler bezeichnen. So würde z. B. der Schimmelgeschmack des Weines zweckmäßigerweise zu den Fehlern gerechnet, weil der Organismus, auf den er zurückzuführen ist, nicht im Wein selbst lebt, sondern die unangenehm wirkenden Geschmacks- und Geruchsubstanzen an der Innenwand leerer Fässer erzeugt. Die bekannte Erscheinung des Böckers würde nach unseren Definitionen zu den Krankheiten zu rechnen sein und wir sehen auch keinen Grund ein, ihn auszuschließen. Man könnte dem entgegenhalten, daß der Schwefelwasserstoff aus Schwefel gebildet werde, der durch menschliches Zutun in den Wein gelangte; allein schon dies bildet keinen eigentlichen Gegengrund; zudem ist nachgewiesen, daß Schwefelwasserstoff auch aus in den Traubenbeeren vorhandenen Substanzen entstehen kann. In beiden Fällen sind es also doch im Weine lebende Organismen, die den Schwefelwasserstoff, also die ungünstige Veränderung des Weines verursachen. Fälle, in denen die ungünstige Veränderung des Weines mehr nur eine indirekte Folge der Organistentätigkeit ist, wie z. B. das Schwarzwerden, wären vorläufig in der Gruppe der Fehler des Weines zu belassen.

Die durch Organismen im Weine verursachten Veränderungen würden wir (die alkoholische Gärung ausgeschlossen) folgendermaßen gruppieren:

A. Krankheiten.

1. Kahmigwerden durch *Mycoderma vini*.
2. Essigstich, verursacht durch Essigbakterien.
3. Milchsäurestich, verursacht durch die sog. Milchsäurebakterien.
4. Mannitgärung, verursacht durch Mannitbakterien.
5. Das Zäh- oder Lindwerden, verursacht durch Bakterien, Schleimhefen, *Dematium* usw.
6. Böckser, verursacht durch Sproßpilze.
7. Mäuselgeschmack, erzeugt durch Bakterien.
8. Umschlagen der Weine (pousse und tourne), verursacht durch Bakterien.
9. Das Bitterwerden, verursacht durch Bakterien eventuell Schimmelpilze.
10. Buttersäurestich, verursacht durch Buttersäurebakterien.

B. Säureabbau durch Bakterien und Hefen.

Von diesen 10 Krankheiten möchten wir die zwei ersten, das Kahmigwerden und den Essigstich, da sie bisher schon eine gründliche Bearbeitung gefunden und wohl auch am leichtesten zu umgrenzen sind, von unseren weiteren Darlegungen ausnehmen. Von den übrigen soll zunächst das bisher Bekannte über Wesen und Ursache in aller Kürze zusammengestellt werden.

Den Milchsäurestich beobachtet man wohl am häufigsten in Obst-, namentlich in ursprünglich säurearmen Birnweinen. Doch kann er auch in milden Traubenweinen auftreten, sowie in gallisierten, stark gestreckten Weinen. Dementsprechend findet sich diese Krankheit in den säure-

reicheren Weinen nördlicher Gegenden (Schweiz, Deutschland, Niederösterreich) selten, häufiger dagegen in Weinen südlicher Herkunft. Die Krankheit äußert sich durch einen süßlich-säuerlichen, etwas kratzenden Geschmack und einen Geruch, der am meisten an unverdorbenes Sauerkraut erinnert. Schärfer läßt sich die Krankheit charakterisieren durch den Befund der chemischen Untersuchung, indem die milchsäurestichigen Getränke neben hohem Gehalt an Milchsäure auch ziemlich viel Essigsäure enthalten. Wenn in Babo und Mach (2; p. 685) angegeben ist, der Milchsäurestich der Weine sei charakterisiert durch den Geruch nach Milchsäure, so beruht dies auf einem Irrtum, da sich die Milchsäure durch vollständige Geruchlosigkeit auszeichnet. Unserer Ansicht nach rührt der eigenartige Geruch milchsäurestichiger Weine von Estern der Milchsäure her, wenn wir auch nicht in der Lage sind, dies vorderhand direkt nachzuweisen. Auf keinen Fall ist dieser Geruch zurückzuführen auf im milchsäurestichigen Weine vorhandene Buttersäure, wie E. Kramer (1; p. 128), W. Seifert (4; p. 12), Meißner in Babo und Mach (2; p. 699) und Neßler-Windisch (2; p. 439) übereinstimmend annehmen, die sich wohl auf den von Mach und Portele (1) näher dargestellten Fall eines aus mit kalkhaltiger Erde bespritzten Trauben hergestellten, stark entsäuerten Weines beziehen und die Erscheinung auch als Zickendwerden des Weines bezeichnen. Es handelt sich in diesem Falle um eine vom Milchsäurestich vollständig abweichende Erscheinung, vielleicht um eine der Milchsäuregärung folgende Buttersäuregärung.

In der französischen Literatur findet sich eine besondere Bezeichnung für den Milchsäurestich nicht, wenn auch außer Zweifel steht, daß in den säurearmen französischen Weinen, soweit sie keinen hohen Alkoholgehalt aufweisen, bei der hohen Temperatur der Aufbewahrungsräume diese Krankheit häufig auftritt: meist wird sie von den französischen Forschern wohl mit der Mannitgärung oder mit *tourne* zusammengefaßt worden sein. Aus einer Stelle aus Pasteur (1; p. 42) darf wohl ohne Zweifel geschlossen werden, daß er dort einen milchsäurestichigen Wein vor sich hatte und auch die Beschreibung, die Semichon (1; p. 327) von den mannitkranken Weinen gibt, paßt ziemlich gut auf die milchsäurestichigen.

Bei den Obstweinen beobachten wir, daß die Krankheit in manchen Fällen schon während der alkoholischen Gärung auftreten kann, in anderen sich erst nachher einstellt, wenn die Temperatur im Keller gegen das Frühjahr steigt und die Obstweine noch auf dem Trub lagern. Im ersten Stadium der Krankheit scheint der Wein stark getrübt, gegen das Ende der Milchsäuregärung hin setzen sich die Bakterien ab und es kann dann eine Klärung stattfinden; oft aber auch bleiben solche Weine weiterhin milchig getrübt („federweiß“), wobei dann aber die Trübung nicht von Bakterien, sondern von Ausscheidungen des Getränkes herrührt.

Die den Milchsäurestich verursachenden Bakterien sind die nämlichen, die wir im nachfolgenden Kapitel auch als Erreger der Mannitgärung anführen werden. Es sind Vertreter der Bacteriaceen, die bald als Stäbchen, bald als lange, gegliederte oder ungegliederte Fäden auftreten und wohl der Gruppe der sog. langen Milchsäurebazillen (Kruse, 1; p. 287) einzuordnen sind; hierher gehören die von Müller-Thurgau beschriebenen (3; p. 850; 6; p. 463), ohne Zweifel auch die von Gayon und Dubourg (1; p. 2) untersuchten, und wahrscheinlich auch die von Laborde (3; p. 228), Mazé und Pacottet (1) erwähnten sogenannten Mannitbakterien.

Wenn E. K r a m e r (1; p. 130) mitteilt, daß er in einem schwachen Wein, dem er Traubenzucker und Pepton zusetzte und dessen Säure auf 1,5 ‰ neutralisiert wurde, durch *Bacterium acidilactici* Hueppe das Zickendwerden verursachen konnte, so möchten wir doch bezweifeln, daß es sich hierbei wirklich um den eigentlichen Milchsäurestich handelte und daß diesen Bakterien in normalen Weinen irgendwelche Bedeutung zukomme.

Die M a n n i t g ä r u n g wurde zuerst eingehend bei algerischen und südfranzösischen Weinen untersucht. Die gründlichen Forschungen von G a y o n und D u b o u r g (1 u. 2) haben die chemischen Vorgänge bei dieser Krankheit vollständig klargelegt. Bei Obstweinen ist die Mannitgärung von M ü l l e r - T h u r g a u (5) näher studiert worden. Man weiß jetzt, worauf wir später eingehend zurückkommen werden, daß bei diesem Krankheitsvorgang aus Lävulose Mannit, Milchsäure und Essigsäure entstehen. Dabei werden wohl auch die Ester gebildet, die den milchsäurestichigen Weinen eigen sind. Nach dem vorausgesagten könnte man die Mannitkrankheit als einen besonderen Fall des Milchsäurestiches auffassen, der dann eintritt, wenn die betreffenden Bakterien Lävulose vorfinden. Dagegen ist immerhin zu berücksichtigen, daß Milchsäurestich auftreten kann, ohne Mannitbildung, in Versuchen z. B., wo den Bakterien nur Dextrose geboten wird und nach unseren Beobachtungen in Weinen, wenn der Zucker zur Zeit des Auftretens der Bakterien schon vergoren war.

Aus letzterwähnten Gründen möchten wir daher, abweichend von französischen Forschern, die beiden Erscheinungen, M i l c h s ä u r e s t i c h und M a n n i t g ä r u n g a u s e i n a n d e r h a l t e n, allerdings unter deutlicher Betonung der Tatsache, daß mit der Mannitgärung regelmäßig Milchsäurestich verbunden ist. Da der im Wein gebildete Mannit weder von Hefe vergoren, noch, soweit wir wenigstens beobachteten, von Bakterien weiter zersetzt wird, so zeichnen sich die mannitkranken Weine durch einen auffallend hohen Extraktgehalt aus und es ist gerade dieser, der bei der chemischen Untersuchung eines Weines auf diese Krankheit hinweist. Daß sich ein hoher Mannitgehalt auch geschmacklich bemerkbar macht, ist selbstverständlich, doch kommt natürlich eine noch ungünstigere Wirkung der gleichzeitig gebildeten Essigsäure zu. Über die gesundheitliche Wirkung des Mannits, von welcher Substanz der Wein bis 5 Proz. enthalten kann, liegen sichere Angaben nicht vor.

Das Z ä h e - o d e r L i n d w e r d e n des Weines ist eine infolge der charakteristischen Eigenschaften des Getränkes längst bekannte Krankheit. Die eigenartige ölige Beschaffenheit, das Fadenziehen beim Ausgießen der Flüssigkeit (zähe), das lautlose Fließen ins Glas (lind), das langsame Aufsteigen der Luftblasen und die regelmäßige Trübung sind allgemein bekannte Erscheinungen. Dagegen wurden die eigentlichen Ursachen derselben bis heute noch nicht vollständig klar gelegt.

Schon P a s t e u r (1; p. 62) wies auf den Zusammenhang des Zähe- werdens mit dem Vorkommen von Bakterien hin, die er als Kokken und als charakteristische, rosenkranzartige Verbände von solchen schildert. In der Folge wurden noch verschiedene Organismen in zähen Weinen gefunden, so z. B. von C. B ö r s c h (1) ein *Sarcina*-artiges Bacterium, von R. A d e r h o l d (1; p. 598) ein *Diplococcus*, von E. K r a m e r (1; p. 144) ein

Bacterium, das Stäbchen, oft zu langen Fäden verbunden, bildet und das er *Bacillus viscosus vini* nannte. Sodann haben Mazé und Pacottet (1; p. 490) aus zähen Weinen zwei Bakterien gezüchtet und näher beschrieben, die ziemlich kräftige Stäbchen und Fäden bilden und zu den Mannitbakterien gehören. Ebenso hat Laborde (4) aus linden Weinen zwei Bakterien isoliert, von denen das eine aus Lävulose Mannit zu bilden vermag. Eine eingehende Schilderung der Krankheit und der damit im Zusammenhang stehenden Bakterien findet sich in Kayser und Manceau (1). Sie schildern als Erreger der Krankheit eine Anzahl anaerober Stäbchenbakterien, die als einzelne Kurzstäbchen oder auch zu Ketten vereinigt vorkommen und ebenfalls zur Mannitbildung befähigt sind.

Außer dem eigentlichen durch Bakterien verursachten Zäherwerden des Weines ist eine von R. Meißner (1) beschriebene ähnliche Erscheinung bekannt, die durch Sproßpilze, sogen. Schleimhefen verursacht wird, allerdings nicht in vergorenen Weinen, sondern in Traubensaft und teilweise vergorenem Wein. Auch *Dematium pullulans* kann nach Wortmann (1) gelegentlich einem Traubensaft schleimige Beschaffenheit verleihen.

Über die chemische Natur der die schleimige Beschaffenheit zäher Weine verursachenden Substanz ist nichts sicheres bekannt. Die Untersuchung ist offenbar erschwert durch den Umstand, daß es kaum möglich ist, sie von den andern Stoffen des Weines zu isolieren. Nach den bisherigen Anschauungen liegt wohl ein Umwandlungsprodukt von einem Kohlehydrat, wahrscheinlich von Zucker vor, während andere mehr an Umsetzungsprodukte von Eiweißstoffen denken. Auch ist schon die Ansicht ausgesprochen worden, es handle sich um die aufgequollenen Zellmembranen der betreffenden Bakterien. Um Klarheit über den Charakter des Zäherwerdens zu erhalten, wäre in erster Linie eine Untersuchung der sogen. Schleimsubstanz erforderlich. Außer dieser Substanz, die dem Wein die schleimige Beschaffenheit verleiht, produzieren die Bakterien des zähen Weines sicher noch andere Stoffe, unter denen vielfach Mannit erwähnt wird, so von Laborde, Mazé und Pacottet, Kayser und Manceau. Letztere Forscher führen als weitere Produkte dieser Bakterien auch Milchsäure und Essigsäure an, so daß nach ihren Befunden zu schließen, den Bakterien des zähen Weines der Charakter von Milchsäure- oder Mannitbakterien zukäme. Dementsprechend müßte also ein Wein, der schon vor vollendeter Gärung lind wird, die Eigenschaften des Milchsäurestiches zeigen, was nach vielfachen Beobachtungen nicht wohl der Fall sein kann, auch schon deshalb nicht, weil lind gewordene Weine oft wieder in den normalen Zustand überführt werden können. Zu den weiteren Produkten der Tätigkeit der Bakterien gehört auch noch Kohlensäure und zwar findet sich diese Angabe schon bei Neßler (1; p. 298) und wird weiter bestätigt durch Kayser und Manceau (1; p. 1).

Der Böckser ist charakterisiert durch den Gehalt des kranken Weines an Schwefelwasserstoff, dessen Anwesenheit in manchen Fällen durch den eigenartigen Geruch bemerkbar wird, während gelegentlich daneben noch anderweitige Gerucherscheinungen auftreten können und das Vorhandensein des Schwefelwasserstoffes nicht sofort erkennen lassen. Einfache chemische Reaktionen z. B. mit vorher in Bleiessig getauchtem Filtrierpapier, das man über dem Weine anbringt, führen aber leicht zum sichern Entscheid.

In den meisten Fällen kann das Auftreten von Schwefelwasserstoff auf die Anwesenheit von freiem Schwefel während der Gärung zurückgeführt werden, wie schon Neßler (1; p. 320) nachgewiesen hat. Meist üben die Weinhefen diese Wirkung aus; doch ist nicht ausgeschlossen, daß auch im Wein wachsende Bakterien Schwefelwasserstoff aus freiem Schwefel zu bilden vermögen. Außerdem sollen nach Neßler (1; p. 319—320) auch der Weinbergboden, sowie gewisse Dünger Ursache einer ähnlichen Erscheinung im Wein sein. Andererseits wurde auch vielfach der durch Zersetzung der Hefe verursachte unangenehme Geruch und Geschmack (Hefegeschmack) als Böckser bezeichnet, ohne daß in diesen Fällen das Vorkommen von Schwefelwasserstoff nachgewiesen worden wäre. Daß die Bildung von Schwefelwasserstoff im Wein in Abwesenheit von freiem Schwefel, also aus Verbindungen desselben durch Hefen stattfinden kann, wurde von Osterwaller (1) zuerst experimentell durch Reinkulturen festgestellt und von Schander (1; p. 85) bestätigt. Bei dieser Bildung von Böckser aus Schwefelverbindungen können sowohl unorganische wie organische Verbindungen in Betracht kommen.

Fälle, in denen Schwefelwasserstoff im Wein ohne Mitwirkung von Organismen z. B. durch rein chemische Vorgänge entstanden wäre, sind bisher nicht nachgewiesen worden; ebenso muß die Annahme, es könnte der Weinstock durch seine Wurzeln Schwefelwasserstoff aus besonders beschaffenen Weinbergsböden aufnehmen und diese Verbindung dann unverändert in die Traube und den Wein übergehen und so eine Art Böckser (Erdgout) verursachen, zurückgewiesen werden. Wenn nun also der Schwefelwasserstoff stets das Produkt von im Wein lebenden Organismen ist, so wird man dazu kommen, die geschilderte Erscheinung nicht als Fehler, sondern als Krankheit aufzufassen. Derselben wird aber, weil ihr Fortschreiten beschränkt ist, ein größeres Gewicht nur dann beizulegen sein, wenn solche Mengen von Schwefelwasserstoff entstehen, daß dieser bei der weiteren Behandlung nicht von selbst verschwindet.

Das Umschlagen der Weine. Unter der Bezeichnung „maladie des vins tournés“ (Umschlagen der Weine) hat Pasteur (1; p. 33) eine durch Bakterien verursachte Krankheit verstanden und Neßler hat sich diesem Sprachgebrauch angeschlossen. Wir sehen keinen Grund ein, warum man hiervon abgehen und alle Trübungen, sogar auch noch das Braunwerden der Weine, unter dieser einen Bezeichnung zusammenfassen sollte. Im Gegenteil ist es im Interesse der Sache geboten, die Erscheinungen möglichst zu trennen und gesondert zu bezeichnen und so kommen wir dazu, unter Berücksichtigung der Prioritätsrechte als Umschlagen (la tourne) eine Bakterienkrankheit der Weine zu bezeichnen, davon die durch andere Ursachen hervorgerufenen Trübungen zu trennen, sowie auch das ohne Mitwirkung von Bakterien entstehende Braunwerden abzuscheiden und den Ausdruck „la Casse“ nicht durch „Umschlagen“, sondern etwa durch „Brechen“ zu übersetzen.

Als Umschlagen (tourne, pousse) faßte Pasteur eine Weinkrankheit auf, die sich namentlich beim Eintritt der wärmeren Jahreszeit bei französischen Rotweinen einstellt, wobei diese tiefgreifende Umänderungen erleiden. Dabei zeigt sich zunächst eine Trübung („ondes soyeuses“), verursacht durch Bakterien, eine Erscheinung, die man auch bei anderen Bakterienkrankheiten beobachtet. Bald aber tritt, namentlich bei Luftzutritt,

auch eine Änderung der Farbe ein, ähnlich derjenigen beim Braunwerden. Auch beim Umschlagen werden dann gewisse Stoffe ausgeschieden, wie namentlich der rote Farbstoff und so wird oft ein recht beträchtliches Depot gebildet. Tiefgreifend sind auch die Veränderungen des Geruchs und Geschmacks des Weines. Die umgeschlagenen Weine schmecken nach *Pasteur* fade oder wie schon *Rosier* im Jahre 1770 (nach *Pasteur* 1; p. 33) schreibt: platt, schwach und schlecht. Nach *Pasteur* (1; p. 34) sind auch Obstweine, gewisse Weißweine und Bier der Krankheit ausgesetzt. Daß die Weine beim Umschlagen Kohlensäure entwickeln, wurde ebenfalls schon von *Pasteur* beobachtet, der angibt, daß der Wein im Faß einen deutlichen Druck ausübe und beim Öffnen herausspritze. Darauf stützt sich auch die zweite Bezeichnung für die Krankheit: *la pousse*. Wir möchten letztere Bezeichnung nicht aufrecht halten, weil eine Kohlensäureentwicklung bei verschiedenartigen Krankheitserscheinungen wie z. B. beim Milchsäurestich, der Mannitgärung und zudem auch beim Säureabbau sich einstellen und dadurch ein Druck zustande kommen kann. Derartige nicht streng charakteristische Bezeichnungen führen leicht zu Unklarheiten und Verwechslungen, wie dies z. B. bei *Kossowicz* (1; p. 109) der Fall ist, wenn er folgendermaßen sich äußert: „Vom Milchsäurestich werden meist jüngere säurearme Weine befallen; die Franzosen bezeichnen einen solchen kranken Wein auch als „*vin monté*“ oder „*vin qui a la pousse*“.

Als Ursache des Umschlagens führt *Pasteur* dünne Bakterien in Form von Fäden oder Stäbchen an, die er, dem damaligen Stande der Wissenschaft gemäß, nicht genauer beschrieb, aber in verschiedenen Abbildungen darstellte. An einer Stelle seines Werkes (1; S. 42) weist *Pasteur* noch darauf hin, daß das Umschlagen gleichzeitig mit der alkoholischen Gärung stattfinden kann. Der bei einem solchen Versuche erzielte Wein besaß einen unangenehmen säuerlichen Geschmack und war reich an flüchtiger Säure. Dies sowohl wie die weitere Beschreibung weisen jedoch darauf hin, daß *Pasteur* hier nicht das eigentliche Umschlagen vor sich hatte, sondern einen Fall von Milchsäurestich, wie wir diesen schilderten. *Pasteur* selbst sagt, daß der von ihm beobachtete Vorgang an die Milchsäure- und Mannitgärung im Runkelrübensaft erinnere.

Nesler (1; p. 274) faßte das Umschlagen der Weine in mit *Pasteur* übereinstimmender Weise auf und hebt noch besonders hervor, daß dabei der Weinstein an der Faßwand verschwinde und sich an seiner Stelle ein zäher Schleim ablagere. Auch *E. Kramer*, (1; p. 130), der sich eingehend mit dieser Krankheit beschäftigte, betrachtet das Umschlagen des Weines als eine durch Bakterien verursachte Zersetzung, bei der zunächst die Eiweißstoffe vielleicht zu Amidosäuren abgebaut werden, worauf dann die organischen Säuren des Weines, Äpfelsäure, Weinsäure, sowie der Weinstein, zersetzt werden unter Bildung von Ameisensäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Butter- und Milchsäure, ferner Propion- und Tartronsäure, vielleicht auch von Kapronsäure. Diese Zusammenstellung läßt deutlich erkennen, daß *Kramer* neben dem eigentlichen Umschlagen offenbar noch tiefergreifende Zersetzungen, eine förmliche Fäulnis des Weines vor sich hatte. Daraufhin deuten, wie bereits erwähnt, auch die Arten der von ihm aus diesen Weinen gezüchteten Bakterien. *Ducoux* (2; p. 630) schloß sich hinsichtlich der bei dieser Krankheit stattfindenden Veränderungen ebenfalls *Pasteur* an und hebt als ein Merkzeichen das Verschwinden des Weinstein hervor, das nach ihm soweit geht, daß der gelöste Weinstein und sogar die früher

aus gesundem Wein an der Faßwand abgelagerte Weinsteinkruste verschwindet. Auch er betont das schon von P a s t e u r erwähnte Zunehmen der flüchtigen Säure, das er mit dem Verschwinden der Weinsäure in Zusammenhang bringt. Durch eine besondere Methode war es ihm möglich, die Art und Mengenverhältnisse der verschiedenen flüchtigen Säuren zu bestimmen. Von Bedeutung ist dabei die Tatsache, daß bei umgeschlagenen Weinen ein nicht unbeträchtlicher Teil, in einigen Fällen etwa die Hälfte der flüchtigen Säuren Propionsäure ist. Einen weiteren Fortschritt brachte eine Untersuchung von L a b o r d e (3; p. 229), welcher Forscher aus einem umgeschlagenen Wein ein Bacterium züchtete und damit einen gesunden Rotwein mit einem geringen Zuckergehalt zum Umschlagen zu bringen versuchte. In diesem Wein verschwand Weinstein und es konnte nachher die flüchtige Säure als ein Gemisch von Essigsäure mit etwas Propionsäure erkannt werden. Das hier zu Wirkung gekommene Bacterium vermochte aus Lävulose Mannit zu bilden. M a z é und P a c o t t e t (1) gelang es bei einer ungefähr gleichzeitig ausgeführten Untersuchung nicht, mit aus umgeschlagenen Weinen gezüchteten Bakterien in gesunden Weinen diese Krankheit zu erzeugen. Sie neigen im Gegensatz zu L a b o r d e zur Ansicht, daß ein einzelnes Bacterium nicht imstande sei, die Krankheit hervorzurufen, sondern daß dazu das Zusammenwirken mehrerer erforderlich sei, und zwar neben dem P a s t e u r s c h e n Bacterium des umgeschlagenen Weines hauptsächlich noch dasjenige, das das Lindwerden des Weines verursacht. Auch ihre verschiedenen Bakterien waren solche, die aus Zucker reichlich Milchsäure und Mannit erzeugten.

Beim Studium der Literatur erhält man den Eindruck, als wenn die unter der Bezeichnung „Umschlagen“ zusammengefaßten Erscheinungen *tourne* und *pousse* zwei verschiedenartige Krankheiten sein könnten. Schon P a s t e u r spricht eine diesbezügliche Vermutung aus (1; p. 60): „Ich neige zu der Ansicht, daß man unter dem Ausdruck „vins tournés“ verschiedene Krankheiten vereinigt, denen mehr als ein fadenförmiges Bacterium entspricht.“ Nach S e m i c h o n s Ausführungen (1; p. 339) wird häufig zwischen *tourne* und *pousse* in der Weise unterschieden, daß bei der *pousse* eine deutliche Kohlensäureentwicklung stattfindet, während bei der *tourne* dies weniger der Fall sei, dagegen eine Änderung des Weines wie beim Braunwerden eintrete. Geruchs- und Geschmacksänderungen sollen in beiden Fällen in gleicher Weise stattfinden. Allerdings glaubt S e m i c h o n, daß dieser Unterschied mehr von der Möglichkeit der Absorption bzw. des Austrittes der Kohlensäure bedingt sei und es ist wohl denkbar, daß bei einem langsamen Fortschreiten der Krankheit die entwickelte Kohlensäure sich allmählich verflüchtigen kann, so daß dann die äußerliche Erscheinung des Schäumens nicht zustandekommt. Bei der Beurteilung der Krankheit das Hauptgewicht auf die Entwicklung der Kohlensäure zu legen, erscheint uns nicht angängig, nicht nur, weil dieser Vorgang unter Umständen übersehen werden kann, sondern, weil auch Kohlensäureentwicklung bei andern Krankheiten, dem Milchsäurestich oder dem Lindwerden, oder wieder beim Säureabbau sich einstellt. Es eignet sich daher das Wort *pousse* nicht für die Bezeichnung einer speziellen Weinkrankheit und wir haben davon abgesehen, eine Übersetzung des Wortes *pousse* zur Bezeichnung einer solchen zu verwenden. Wenn M a z é und P a c o t t e t (1; p. 490) anführen, daß eine Nährflüssigkeit, die mit den Bakterien des zähen Weines infiziert wurde und dann viel Kohlensäure und Alkohol entwickelte, deshalb die Erscheinung

der unter dem Namen „pousse“ bekannten Krankheit gezeigt habe, so läßt dies erkennen, wohin ein solches Verfahren führen würde.

Gauthier (nach Duclaux 2; p. 644) glaubte allerdings einen tieferen Unterschied zwischen den beiden Erscheinungen gefunden zu haben, indem er angibt, daß die Krankheit „tourne“ charakterisiert sei durch die Anwesenheit von Tartronsäure und Milchsäure, während diese beiden Säuren bei derousse fehlen sollen, wogegen Kohlensäure und Propionsäure gebildet werden. Duclaux kommt zu dem Schluß, daß jede Vergärung von Weinstein, die mit Bildung von Kohlensäure, Essigsäure und Propionsäure in dem von ihm festgestellten Verhältnisse verbunden ist, „maladie de laousse“ genannt werden soll; allerdings will damit Duclaux nicht eine Unterscheidung zwischen „tourne“ und „ousse“ machen, sondern er faßt sie zusammen. Die von Gauthier speziell bei südfranzösischen Weinen gemachten Beobachtungen glaubt er dahin deuten zu sollen, daß die von ihm als „tourne“ bezeichnete Krankheit nicht dem entspricht, was man sonst unter „tourne“ versteht, sondern ein Komplex verschiedener Krankheitserscheinungen sei, bei dem das gewöhnliche Braunwerden, die „ousse“ und eine Krankheit, bei der Tartronsäure gebildet werde, zusammenwirken. Semichon (1; p. 338) schließt sich der Ansicht Duclaux an und bezeichnet die Krankheit des Umschlagens („tourne etousse“) geradezu als Propionsäuregärung.

Die bis heute vorliegenden Beschreibungen der morphologischen Eigenschaften der das Umschlagen verursachenden Bakterien entsprechen nicht den zu stellenden Anforderungen; sie beschränken sich meistens auf die äußere Form der in einem Wein oder einer Kulturflüssigkeit gefundenen Bakterien, ohne auf die Veränderlichkeit solcher Organismen in den verschiedenen Nährböden genügend Rücksicht zu nehmen. So vermissen wir bei den meisten Autoren Angaben über die Dicke der Stäbchen und das Verhalten auf festen Nährböden. Wenn gewöhnlich angegeben wird, diese Bakterien seien anaërob, so ist dies nach den weiteren Ausführungen doch nur so aufzufassen, daß sie anaërob, aber zudem, wenn auch weniger gut, bei Luftzutritt zu wachsen vermögen, also nicht obligate, sondern fakultative Anaëroben sind. Pasteur hat die Bakterien beschrieben als lange zylindrische, meist geknickte Fäden, oft ohne deutliche Gliederung. Aus einer Abbildung in Duclaux (2; p. 629) geht hervor, daß seine Anschauung von der Form der Bakterien mit derjenigen von Pasteur übereinstimmt. Kramer (1; p. 135) bezeichnet die von ihm aus umgeschlagenen Weinen gezüchteten Bakterien als aërob; es sind Fäden und Stäbchen von verschiedener Dicke von 0,3—1 μ und verschiedener Länge, die er als verschiedene Arten, als *Bacillus saprogenes vini* I—VII bezeichnet; 6 davon zeigten Eigenbewegung, einer erwies sich sporenbildend; alle verflüssigten die Gelatine. Daneben fanden sich noch 2 aërobe *Micrococcus*-Arten, die er als *Micrococcus saprogenes vini* I und II bezeichnet, der erste mit 0,5 μ Durchmesser, der zweite mit 1—1,4 μ Durchmesser, die ebenfalls beide die Gelatine verflüssigten. Auch Laborde (3; p. 231), sowie Mazé und Pacottet (1; p. 491) sprechen von fadenförmigen Bakterien. Ersterer hebt hervor, daß der Einfluß des Mediums auf diese Organismen sehr groß sei. Die von letzteren gegebenen Abbildungen (nach Photographien) stellen wiederum ziemlich kräftige Fäden und Stäbchen vor und die Verfasser betonen, daß die Fäden sich unter anaëroben Verhältnissen häufiger finden und ebenso in älteren Kulturen. Die von Laborde sowie die von Mazé und Pacottet aus

umgeschlagenen Weinen gezüchteten Bakterien sind Mannitbildner und haben große Ähnlichkeit mit dem „ferment mannitique“ von Gayon und Dubourg und dem *Bacterium mannitopoeum* Müller-Thurgau. Nach Semichon (1; p. 340) finden sich bei den vins tournés meist Kurzstäbchen, während bei den vins poussés längere gebogene Fäden vorherrschen sollen. Nach Pacottet (1; p. 279) zeigen die Bakterien des vin tourné und des vin poussé auffallende Übereinstimmung. Unterschiede können nach ihm durch das Alter des Weines verursacht werden.

Während, wie aus dem Vorstehenden zu ersehen ist, die wichtigsten Arbeiten über das Umschlagen (tourne) der Weine von französischen Forschern herrühren, ist dieser Krankheit von deutscher Seite wenig Aufmerksamkeit zugewendet worden, was zum Teil wohl damit zusammenhängt, daß dieselbe besonders in Rotweinen und namentlich in Weinen südlicher Gegenden scharf hervortritt; daher mag es auch rühren, daß deutsche Autoren das Wort „Umschlagen“ für eine andere Erscheinung verwendet haben, nämlich für das Wiedertrübwerden des Weines, sei es durch Hefen, Bakterien, Ausscheidungen verschiedener Art (Metalltrübungen), Braunwerden usw. Vgl. Wortmann (3), Meißner (in Babo und Mach (2); p. 706), v. d. Heide (in Babo und Mach (2); p. 718). Wir haben schon eingangs dieses Kapitels dargetan, warum wir uns diesem Vorgehen nicht anschließen können. Auffallen muß es, daß in zusammenfassenden deutschen Werken die eingehenden Arbeiten französischer Forscher so wenig Berücksichtigung gefunden haben und das eigentliche Umschlagen weder in den mit dieser Aufschrift versehenen Abschnitten, noch auch in einem anderen erwähnt wurde.

In schweizerischen Rotweinen konnten wir öfters Erscheinungen beobachten, die mit jenen von französischer Seite der „tourne“ zugeschriebenen vollständig übereinstimmten. Leider haben wir bisher versäumt, diese Weine auf Propionsäure zu prüfen. Dagegen stimmten die darin gefundenen Bakterien in ihrem Aussehen überein mit denen von Mazé und Pacottet sowie von Duclaux aus umgeschlagenen Weinen entnommenen und abgebildeten. Die betreffenden Rotweine aus verschiedenen Gegenden der Schweiz, z. B. aus der „Herrschaft“ des Kts. Graubünden, aus Schaffhausen, Zürcher „Weinland“, Kt. Aargau, Wallis (Dôle) zeigten die charakteristischen Erscheinungen und zwar mit der Zeit immer deutlicher, nämlich anfänglich eine Verschlechterung der Farbe und faden Geschmack, dann Trübung, die bis zu derjenigen der braunen Weine stieg, und dementsprechende Bildung eines starken Depôts, deutliches Hervortreten von scharfem Geruch und Geschmack, eine langsame Kohlensäureentwicklung, die in verschlossenen Gefäßen schließlich einen starken Druck erzeugte.

Das Mäuseln der Weine. Diese Erscheinung, die wir konsequenterweise ebenfalls zu den Krankheiten rechnen, ist dadurch scharf charakterisiert, daß der betreffende Wein den unangenehmen Geruch von Mäuseharn und einen dementsprechenden unangenehmen Geschmack zeigt. Dieser Geruch stimmt völlig überein mit demjenigen, den Acetamid verbreitet. Da die Menschen bezüglich Gerucherscheinungen verschieden empfinden, mag es erklärlich erscheinen, daß hie und da auch andere unangenehm riechende Weine als von Mäuselgeruch behaftet erklärt werden. Beim öfteren Kosten typisch mäuselnder Weine und bei der Wahrnehmung der nach dem Kosten im Gaumen verbleibenden charakteristischen widerwärtigen Empfindung

kommt man doch zu der Überzeugung, daß man es mit einer ausgeprägten, einheitlichen Erscheinung zu tun hat. Da nun bei unseren Versuchen mit reingezüchteten Bakterien, auf die wir in einem weiteren Kapitel näher eingetreten werden, Mäuselgeruch sowohl in verschiedenen Weinen als auch in Nährlösungen erzeugt wurde, halten wir uns für berechtigt, das Mäuseln den Weinkrankheiten einzuordnen; wir glauben nicht irre zu gehen mit der Annahme, daß auch in der Kellerbehandlung der Weine das Mäuseln durch Bakterien entsteht. Damit stimmen dann auch verschiedene Angaben der Literatur überein, so z. B., wenn in Neßler-Windisch (2; p. 455) sich die Angabe findet, daß der Mäuselgeschmack auftrete, wenn der Wein schlecht gäre und zu lange, namentlich in wärmeren Räumen, auf der Hefe liege, so daß diese sich zersetze; ferner, daß mäuselnder Wein stets größere Mengen flüchtiger Säure enthalte, die aber nicht durch Essigbakterien gebildet worden, sondern bei Luftabschluß entstanden sei. Bisher ist von keiner anderen Seite das Mäuseln in einwandfreier Weise auf Bakterientätigkeit zurückgeführt worden, und so ist es erklärlich, daß es bis jetzt von allen Autoren unter den Fehlern aufgeführt wurde.

Das Bitterwerden der Rotweine. Wie schon die Bezeichnung andeutet, tritt diese Krankheit wenn auch nicht ausschließlich, so doch vorzugsweise in Rotweinen auf. Sie ist an dem ausgesprochenen bitteren Geschmack des Weines zu erkennen, neben dem dann auch noch andere Veränderungen der Weinbestandteile bemerkbar werden. De Vergnette-Lamotte (nach Pasteur (1; p. 66) gibt von diesen Weinen eine treffende Beschreibung, die hier reproduziert zu werden verdient, namentlich deswegen, weil sie historisches Interesse besitzt. Sie wurde vom Verf. brieflich an Pasteur übermittelt, als dieser seine klassische Untersuchung über das Bitterwerden begann: „Wir unterscheiden zwei Arten des Bitterwerdens der Weine, die erste, die sie im 2. oder 3. Jahre ergreift, und die andere, welche man in sehr alten Weinen antrifft. Dieser letzteren Krankheit, welcher man eigentlich den Namen „Altersgeschmack“ geben kann, kommt lange nicht die Bedeutung zu wie der ersteren, deshalb, weil die davon befallenen Weine gut waren und lange Jahre hindurch gut geblieben sind, während die eigentliche Bitterkrankheit den Wein in den ersten Jahren verändert und selbst vollständig zerstört. Beim Beginn des Übels zeigt der Wein einen eigenartigen Geruch; die Farbe ist weniger lebhaft; der Geschmack wird fade. Unsere Küfer sagen, der Wein werde süßlich. Der bittere Geschmack ist noch nicht hervortretend, aber er steht nahe bevor, wenn man nicht einschreitet. Alle diese Eigenschaften zögern dann nicht, rasch zuzunehmen. Bald wird der Wein bitter und man erkennt bei der Kostprobe einen leichten Gärgeschmack, verursacht durch die Anwesenheit von Kohlensäure. Schließlich kann die Krankheit noch zunehmen, der Farbstoff wird verändert, der Weinstein zersetzt und der Wein ist nicht mehr genießbar. . . . Das Bitterwerden ist für uns die organische Krankheit der Weine des Pinôt („Burgunder“). Es ist im Grunde die einzige Krankheit, die bei ihnen zu befürchten ist.“

Beim Bitterwerden treten also Veränderungen verschiedener Art ein, einmal der Bittergeschmack, sodann ein eigenartiger Geruch, ferner Trübungen, Veränderungen der Farbe und endlich chemische Veränderungen anderer Inhaltsstoffe (Gerbstoff, organische Säuren usw.). Nach Pasteur sind es namentlich Weine guter Qualität und zwar insbesondere die besseren Bur-

gunderweine, seltener auch die Bordeauxweine, die der Krankheit des Bitterwerdens unterworfen sind, während leichtere Weine nach ihm mehr zum Umschlagen neigen. Er konstatierte dieses Verhalten bei Weinen aus dem gleichen Jahrgange. Daß man die Bitterkrankheit hauptsächlich bei guten Flaschenweinen beobachtet, mag also in erster Linie auf diese größere Empfänglichkeit zurückzuführen sein, sodann aber gewiß auch darauf, daß eben nur bessere Weine auf Flaschen gefüllt, längere Zeit aufbewahrt und so eben noch in späteren Jahren von der Krankheit befallen werden können, wo die billigeren Weine des gleichen Jahrganges nicht mehr vorhanden sind. Daß wirklich Weine lange Jahre hindurch gesund bleiben und dann erst bitter werden können, geht aus verschiedenen von P a s t e u r erwähnten Fällen hervor. So wurde ein Wein von Pomard erst nach 17 Jahren bitter, ein anderer Wein sogar erst nach 30 Jahren. P a s t e u r nimmt hier an, daß solche Weine im Laufe der längeren Zeit sich allmählich derart verändert hätten, daß dann die Bakterien des Bitterwerdens wachsen konnten. Nach seinen Untersuchungen werden beim Bitterwerden die Weinsäure und der Weinstein nicht angegriffen, durch welches Merkmal sich diese Krankheit scharf vom Umschlagen unterscheiden würde. Bei einem von ihm und in der Folge von D u c l a u x untersuchten „Pomard“ (1863), bei welchem 1865 die Bitterkrankheit auftrat, nahm im Laufe der weiteren Entwicklung der Krankheit die flüchtige Säure zu, aber auch der Gehalt an nicht flüchtiger Säure wurde vermehrt (D u c l a u x 2; p. 641). Da nach P a s t e u r s sonstigen Beobachtungen und auch im vorliegenden Fall eine Glyzerinabnahme beim Bitterwerden eintritt, so schloß D u c l a u x, daß jene Säurezunahme vielleicht einer Glyzeringärung zuzuschreiben sei. Die beim Bitterwerden beobachtete Farbstoffabnahme erklärt sich teils durch Zersetzung, teils durch Ausscheidung von Farbstoff. P a s t e u r, der der Untersuchung des Depots solcher Weine besondere Aufmerksamkeit widmete, teilt mit, daß sich dort ausgeschiedener Farbstoff finde, teils in Form von an der Flaschenwand gebildeten und später teilweise losgelösten Lamellen, teils in Form von Inkrustationen um die Bakterien und auch in Form von kleinen einzelnen oder zu Konglomeraten vereinigten kugelförmigen Ausscheidungen. Diese Inkrustationen lösen sich in Alkohol und Säuren.

Das Hauptgewicht legt P a s t e u r bei seinen Untersuchungen auf das Vorhandensein von stäbchenförmigen Bakterien von ganz bestimmter Gestalt, denen er das Zustandekommen der Krankheit zuschreibt. Wenn er auch, dem damaligen Stande der Wissenschaft entsprechend, diese Bakterien nicht rein kultivierte und untersuchte, sowie auch nicht damit einen gesunden Wein bitter machte, so wird man doch mit Rücksicht auf seine außerordentlich scharfsinnigen und gewissenhaften Beobachtungen seiner Auffassung großes Gewicht beilegen dürfen. Dabei bleibt es ja immer noch ein Erfordernis, in Zukunft jene soeben erwähnten Bedingungen zu erfüllen. P a s t e u r führt auch einen Umstand an, bei dem das Bitterwerden ohne Bakterien zustande kommen kann. Er schreibt nämlich, daß der im Anbruch liegende Wein oft durch die einzige Tatsache der Lufteinwirkung eine unzweifelhafte Bitterkeit annehme, die von selbst verschwinde und zwar, wenn man den Wein von der Luft abschließe, z. B. in aufgefüllten Flaschen, schon nach einigen Wochen.

N e u b a u e r (1; p. 27), der in bitteren Weinen denselben Organismus wie P a s t e u r konstatierte, fand den Gesamtsäuregehalt in normalen und bitteren Weinen fast gleich, konstatierte dagegen eine Abnahme des Gehaltes

an Farbstoff und Gerbstoff, allerdings nur eine geringe (um 0,23 g pro Liter). Da beim Bitterwerden bekanntlich Farbstoff ausgeschieden wird, so ist nicht unmöglich, daß die von Neubauer beobachtete Abnahme diesem Umstand zugeschrieben werden kann. Allerdings behauptet dann Bersch (1; p. 611), daß beim Bitterwerden der Gerbstoff in Gallussäure umgewandelt werde. Nach ihm nimmt auch der Gehalt an Weinsäure ab, und er glaubt, daß die geringe Menge entstehender Kohlensäure hierauf zurückzuführen sei. Die Widersprüche bezüglich der Säureabnahme rühren vielleicht davon her, daß im Anfang des Krankheitsvorganges die von den Trauben herstammenden organischen Säuren angegriffen werden, worauf der von verschiedenen Autoren hervorgehobene weniger saure, fade Geschmack hinweist, während dann im weiteren Verlauf die neu gebildeten Säuren wie Milchsäure usw. dem Getränk einen erhöhten Gehalt an nicht flüchtiger Säure (früher als Weinsäure betrachtet) verleihen. Auch nach H. W. Dahlen (1; p. 755) erleidet die freie Säure eine Abnahme.

Später wurde die Krankheit des Bitterwerdens noch öfter in Untersuchung genommen; so gibt E. Kramer (1; p. 145) an, daß bei dieser Erscheinung der Weinstein unter Bildung von Kohlensäure zersetzt und schließlich auch der Farbstoff zerstört werde, was ebenfalls von Babo und Mach (1; II. Bd. p. 613) erwähnt wird. Nach E. Kramer hat es den Anschein, als ob aus der Zersetzung des Weinstein durch die Bakterien eine bitter schmeckende Substanz hervorgehen würde. Es gelang diesem Forscher nicht, mit den Bakterien eines bitteren Weißweines aus dem österreichischen Küstenlande einen gesunden Wein bitter zu machen.

Von Peroncitto und Maggiora (1; p. 459) wird angegeben, daß schwache Weine, Peronospora-Weine, bitterkrank wurden. Mit den aus einem solchen Wein in Fleischbrühe mit Pepton und Glycerin kultivierten Bitterbakterien (ob reingezüchtet?) vermochten sie einen alkoholarmen Wein innerhalb 40 Tagen bitter zu machen. Bordas, Joulin und Raczkowsky (1 u. 2) impften mit einem aus einem bitteren Wein isolierten Bacillus einen durch Filtration mittels Chamberland-Filter sterilisierten Wein. Es traten nach 6 Monaten als Folgen der Krankheit, bitterer Geschmack, Trübung, Ausfällung des Farbstoffes, Vermehrung der flüchtigen Säure und Verminderung des Gehaltes an Glycerin und Zucker deutlich hervor. Der Glyzeringehalt sank von 7,5 auf 4,8 ‰, der Weinsteingehalt von 3,4 auf 1,3 ‰. Außerdem fanden die Verf. in den Weinen Buttersäure. Auch Duclaux (2; p. 643) hat sich mit der Bitterkrankheit beschäftigt. Außer den mit Pasteur gemeinschaftlich erzielten Versuchsergebnissen, die bereits erwähnt wurden, mögen noch folgende angeführt werden. Er spricht sich zunächst dahin aus, daß bei der Bitterkrankheit fixe und flüchtige Säuren gebildet werden und daß die letzteren nicht die gleichen sind wie beim Umschlagen. Buttersäure soll öfter an Stelle der Propionsäure auftreten, aber im Verhältnis zur Essigsäure nur in geringer Menge; der eine Wein von Pomard enthielt nach 10 Jahren 1,83 ‰ Essigsäure und 0,19 ‰ Buttersäure.

Semichon (1; p. 362), der den Versuch machte, die Weinkrankheiten nach dem charakteristischen Gärprodukt der Bakterien einzuteilen, bezeichnet die Krankheit des Bitterwerdens als *fermentation butyrique*. Er stützt sich hierbei ausschließlich auf die beiden vorerwähnten Befunde, was kaum als zulässig erachtet werden kann, da der von Bordas usw. gezüchtete Organismus von dem eigentlichen Bitterferment abweicht

und anderseits die von Duclaux festgestellten Buttersäuremengen doch außerordentlich gering sind.

Mazé und Pacottet (1; p. 548), die sich ebenfalls mit der Bitterkrankheit beschäftigten, waren bestrebt, aus bitter gewordenen Weinen das Ferment herauszuzüchten und damit in gesunden Weinen die Bitterkrankheit zu erzeugen, was ihnen aber nicht gelang.

Bei den bitteren Rotweinen, die wir selbst untersuchten, fanden wir regelmäßig die von Pasteur beschriebenen Bakterien. Da es sich in der Regel um Weine handelte, die klar auf Flaschen gefüllt worden waren und erst nachher bitter wurden, so neigen wir aus diesem Grunde zu der Ansicht, daß in solchen Fällen die Krankheit wirklich durch die Bakterien verursacht wurde. Die Untersuchung auf den Gehalt an flüchtiger Säure und Milchsäure in solchen Weinen ergab:

	Gesamtsäure als Weinsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Milchsäure
Maiefelder Rotwein . . .	6,07 ‰	0,97 ‰	4,26 ‰
Wallenstadter Rotwein .	6,82 ‰	1,84 ‰	5,04 ‰

Das Hauptmerkmal der bitteren Rotweine ist, wie auch der Name erkennen läßt, ein Bitterstoff, der im Wein gelöst ist. Neubauer (1; p. 27) macht besonders darauf aufmerksam und betont, daß der Bitterstoff nicht am Ferment selbst fest haften. Nach Wortmann (4; p. 732) scheidet sich im Laufe der Zeit ein Teil des Bitterstoffes aus und findet sich dann in dem Depôt, und zwar ist er der Ansicht, daß die kugeligen Gebilde, die Pasteur als ausgeschiedenen Farbstoff betrachtete, entweder ganz oder zur Hauptsache aus Bitterstoff bestehen und den Farbstoff in sich aufnehmen. Beim Erwärmen eines Weines mit diesen Ausscheidungen lösen sich diese und der Wein erscheint nachher wieder stärker bitter. Verschiedene Beobachtungen weisen darauf hin, daß bitterkranke Weine durch Ausscheidung des Bitterstoffes ohne weiteres wieder genießbar werden.

Über die Entstehung des Bitterstoffes finden sich in der Literatur mehrere Angaben, ohne daß sie jedoch genügend bewiesen wären. In den älteren Werken von L. v. Babo (1; p. 153, zitiert nach Neubauer) und Julien (1; p. 78, zitiert nach Neubauer) wird als Ursache der Krankheit die Bildung von bitterschmeckendem Zitronensäureäther angegeben. Mulder (1; p. 135) zieht diese Ansicht in Zweifel mit der Frage, woher diese Zitronensäure komme, und hebt gleichzeitig hervor, daß weinsaures Amyloxyd ebenfalls bitter sei und vielleicht eher im Weine entstehe. Der Umstand, daß die Bitterkrankheit fast ausschließlich in Rotweinen auftritt, gab schon früh Veranlassung, die Bildung des Bitterstoffes aus Gerbstoff anzunehmen. So ist z. B. bei Hellenthal-Beyse (1; p. 218) das Tannin als Ursache des Bitterwerdens bezeichnet, allerdings mehr in dem Sinne, daß das Bitterwerden von einem Überschuß des Tannins herrühren könne, der entstehe, wenn der Wein lange auf Trebern gäre oder Gerbstoff aus dem Holz der Gärständen aufnehme. Ebenso neigen Neubauer (1; p. 27) und Dahlen (1) zu der Annahme, daß das Bitterwerden auf Veränderungen des Gerbstoffes beruhe. Unter den späteren Forschern vertritt auch Wortmann (4) diese Anschauung. Bersch (1; p. 611) glaubt, wie schon erwähnt, nachgewiesen zu haben, daß aus Gerbstoff Gallussäure und vielleicht

Pyrogallussäure entstehe. Nun schmeckt allerdings Gallussäure nicht bitter, wohl aber Gallussäureäthyläther, der bei längerem Verweilen von Gallussäure im Wein wohl entstehen kann. Nach Trillat (1; K. J., p. 276) rührt der Bittergeschmack von der Bildung von Aldehyd und Ammoniak und Oxydation des Aldehydammoniaks zu einem bitteren Harz her. Es gelang ihm, Rotwein durch Zusatz kleiner Mengen von Aldehyd und Ammoniak auf künstlichem Wege bitter zu machen. Daneben entstehe auch noch das sehr stark riechende Acetal. Sowohl Pasteur als Duclaux konnten eine mit dem Bitterwerden verbundene Abnahme des Glycerins feststellen. Damit läßt sich vielleicht die Ansicht von Voisenet (1) in Zusammenhang bringen, nach dem in bitteren Weinen stets Acrolein vorhanden ist, das sich aus dem Glycerin bildet. Nach seiner Ansicht ist der eigenartige Geschmack bitterer Weine auf Acroleinharz zurückzuführen.

Wie aus vorstehender Zusammenstellung hervorgeht, sind die Ansichten über die Entstehung des Bitterstoffes sehr verschieden und liegt für keine derselben ein zwingender Beweis vor. Diese unbefriedigende Lage mag zum Teil verursacht sein durch die Schwierigkeit, die einer genauen Feststellung der in Betracht kommenden Verbindungen z. T. entgegensteht, aber auch dadurch, daß die Chemie die Kenntnis der hier in Betracht kommenden Pflanzenstoffe bisher verhältnismäßig wenig gefördert hat.

Als Erreger der Bitterkrankheit hat Pasteur ein von ihm näher beschriebenes Bacterium betrachtet; allerdings vermochte er, wie schon erwähnt, nach dem damaligen Stand der Wissenschaft nicht, diese Anschauung durch endgültige Beweise zu stützen, allein seine Beobachtungen sind so mannigfaltig und so gewissenhaft durchgeführt, daß ihnen nicht jede Beweiskraft abgeht. Sie werden außerdem unterstützt durch zahlreiche spätere Beobachter, die den von Pasteur beschriebenen Organismus immer und immer wieder in bitteren Rotweinen vorfanden. Auch wir haben in zahlreichen Rotweinen verschiedener Herkunft dieses Bacterium nachweisen können, und zwar gewöhnlich in solcher Zahl und Reinheit, daß man unwillkürlich zu der Ansicht geführt wird, dasselbe als Ursache der Krankheit zu betrachten. Nun soll ja gewiß zugegeben werden, daß die Erzeugung der Krankheit durch Reinkulturen des Organismus allein imstande ist, vollständige Sicherheit zu verschaffen; allein bis dies in einwandfreier Weise geschehen und die Möglichkeit dazu erwiesen ist, wird man berechtigt sein, das Bacterium Pasteurs als wahrscheinlichen Erreger der Krankheit zu bezeichnen. Pasteur (1; p. 77 u. 80) beschreibt den Organismus als Stäbchen und Fäden, dicker und etwas mehr gegliedert als die Bakterien des umgeschlagenen Weines. Nach seinen Abbildungen zu urteilen, gehören sie zu den kräftigst gebauten Bakterien, die man im Wein findet. Besonders eingehend sind in den Abbildungen Pasteurs die Inkrustationen dargestellt, die diese Bakterien erleiden und die ja wohl weniger als ein Artcharakteristikum gelten können, als vielmehr von den durch die Bakterien verursachten chemischen Veränderungen des Weines abhängen. Duclaux (2; p. 639) gibt an, daß diese Pasteurschen Bakterien des bitteren Weines in der Dicke selten 1 μ übersteigen. Die von Peronitto und Maggiora (1; p. 459) in bitteren jüngeren Weinen gefundenen Bakterien bestanden aus 5—6 μ langen und 1 μ dicken Stäbchen, die meist zu langen ineinander verschlungenen Fäden verbunden waren. Mit diesen in schon angeführter künstlicher Lösung gezüchteten Bakterien gelang es dann nach ihren Angaben, einen alkoholarmen Rotwein bitter zu machen. Es ist ja selbstverständlich,

daß nicht jedes aus bitteren Rotweinen gezüchtete Bacterium mit dem von Pasteur beobachteten identisch ist. So isolierten Bordas, Joulin und Raczowsky (1 u. 2; p. 148) aus einem bitteren Wein einen Bacillus, von dem sie angeben, daß er einen gesunden Wein bitter zu machen vermochte und dessen Stäbchen eine terminale Spore und ein polares Geißelbündel zeigten, Merkmale, die beim Pasteurschen Bitterferment nie beobachtet wurden. Wortmann (4) fand in einer größeren Zahl bitterer Weine ebenfalls Bakterien und unter diesen das Pasteursche Bitterferment. Er bezeichnete dasselbe als *Bacillus vini*, ohne jedoch Reinkulturen hergestellt und ohne den Organismus morphologisch oder physiologisch untersucht zu haben. Die Abbildungen geben ebenfalls keinen Aufschluß über den Charakter des Bacteriums, so daß dieser Bacillus in der bakteriologischen Literatur nicht berücksichtigt werden kann. Dasselbe gilt auch von einem zweiten von Wortmann angeführten Organismus, dem *Micrococcus vini*. Bei der Besprechung seines *Bacillus vini* hält Wortmann es nicht für unmöglich, daß unter den charakteristischen Formen, unter welchen er auftritt, verschiedene Rassen verborgen seien, ähnlich wie *Saccharomyces ellipsoideus* Rees nach Hansen in eine Anzahl Rassen *Saccharomyces ellipsoideus* I, II usw. zerfalle. Da er diesen *Bacillus vini* auch in Weinen fand, die nicht bitter waren und anderseits bittere Weine untersuchte, in denen sich *Bacillus vini* nicht vorfand, so schließt er, daß dieser Organismus, sowie *Micrococcus vini*, von dem das Gleiche gilt, nicht die Erreger der Bitterkrankheit seien.

Mazé und Pacottet (1; p. 491) haben aus bitteren Rotweinen 4 Bakterien gezüchtet, von denen sie angeben, daß sie in ihrer Form dem Bacterium des umgeschlagenen Weines vollständig gleichen und ebenfalls mit dem „ferment mannitique“ von Gayon und Dubourg übereinstimmen. Auch im physiologischen Verhalten gleichen ihre Bakterien dem letzteren, indem sie aus Glukose Alkohol, aus Lävulose Mannit, und daneben ebenfalls noch Essigsäure, Milchsäure, Spuren von Bernsteinsäure und etwas Glyzerin bilden. Versuche, mit diesen Bakterien gesunde Weine bitter zu machen, führten jedoch nicht zum Ziel.

Auffällig ist die verschiedene Beurteilung der Bitterbakterien hinsichtlich ihres Verhaltens zum Sauerstoff. Schon das Auftreten und die Vermehrung der Organismen in gefüllten Fässern und verschlossenen Flaschen weist jedenfalls auf ein geringes Sauerstoffbedürfnis hin. Pasteur führt ausdrücklich an, daß sie ohne Sauerstoff sich entwickeln können. Laborde (1) rechnet die Bakterien des bitteren Weines zu den Aëroben, ohne scharf hervorzuheben, ob fakultativ oder obligat aërob. Im Gegensatz hierzu bezeichnen Mazé und Pacottet (1; p. 548) diese Bakterien als streng anaërob und empfehlen dementsprechend als Schutzmittel gegen die Krankheit Zufuhr von Sauerstoff. Auch Semichon (1; p. 312) zählt das Bitterwerden zu den durch anaërobe Organismen verursachten Weinkrankheiten, während Wortmann wiederum von seinem *Bacillus vini*, der wie erwähnt, indentisch sein soll mit dem Bitterferment Pasteurs, angibt, er sei sicher nicht anaërob, sondern im Gegenteil luftbedürftig und könne überhaupt nicht anaërob gezüchtet werden. In Anbetracht der Umstände, die beim Bitterwerden zur Geltung gelangen, möchten wir die Bakterien des bitteren Weines als fakultative Anaërobier bezeichnen.

Schon 1869 betont Adolf Mayer (Wortmann 4; p. 709),

10*

daß die Bitterkrankheit höchstwahrscheinlich nicht durch einen im Wein lebenden Pilz, sondern durch eine chemische Reaktion schon vorhandener vielleicht von Schimmelpilzen in Trauben gebildeter Substanzen zustande komme. Große Bedeutung für das Entstehen der Bitterkrankheit legt Wortmann (4) diesen Fäulnisvorgängen in den Trauben bei. Er stützt sich hierbei auf einige Versuche, bei welchen z. B. ein entalkoholisierter Wein, dem er Zucker und Botrytis-Sporen zuführte und nach Bildung einer Pilzdecke durch Hefe vergären ließ, bitter wurde, während ein gleich behandelter Wein ohne Pilze nicht bitter war. Ebenso ließ er die Maische von faulen Beeren vergären, ferner von gesunden, sowie von einem Gemisch von faulen und gesunden. Die Weine zeigten in dem Maße, als sie aus Saft fauler Beeren entstanden waren, eine zunehmende Steigerung des bitteren Geschmacks. Als wesentlichstes Resultat seiner mikroskopischen Beobachtungen hebt er hervor, daß man nicht berechtigt sei, die Krankheit des Bitterwerdens auf die Wirkung bestimmter Bakterien zurückzuführen, sondern daß diese Krankheit auf andere Ursachen und zwar auf der Wirkung verschiedener Organismen im Weine, mit früher oder später darauffolgender Sauerstoffeinwirkung, beruhe. Er (4; p. 731) faßt seine Beobachtungen und Versuchsergebnisse, wie auch die bereits vorliegenden wissenschaftlichen und praktischen Erfahrungen folgendermaßen zusammen: „Bei allen Rotweinen besteht die Möglichkeit zum Bitterwerden und diese Möglichkeit ist, abgesehen von der Komposition des Traubensaftes bzw. von der Traubensorte, im wesentlichen von der durch die ganze Art und Weise der Rotweinbereitung gegebenen stofflichen Zusammensetzung der Rotweine bedingt. Es sind zweifellos die im Rotweine enthaltenen Gerbstoffe, welche vielleicht, aber nicht wahrscheinlich, durch ihre Qualität die Grundstoffe liefern, aus deren chemischer Veränderung die den bitteren Geschmack des krank gewordenen Weines bedingenden Bitterstoffe hervorgehen. Diese chemischen Veränderungen der Gerbstoffe werden hervorgerufen durch die Lebenstätigkeit von pilzlichen Organismen; und zwar von Schimmelpilzen, von denen in erster Linie der Edelfäulepilz, *Botrytis cinerea*, in Betracht kommt. Dabei erscheint die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß auch Bakterien in derselben Weise wirken können, allein es liegt hierfür bis jetzt kein positiver Beweis vor. Ob es sich bei der Tätigkeit der Organismen um einen im Plasma unmittelbar sich abspielenden Stoffwechselprozeß oder ob es sich um eine außerhalb oder innerhalb der Zelle vollzogene enzymatische Spaltung handelt, muß vor der Hand dahingestellt bleiben. Nur soviel ist sicher, daß in allen Fällen die Tätigkeit der Organismen allein nicht genügt, indem aus den zerlegten Gerbstoffen die Bitterstoffe nicht unmittelbar entstehen, sondern erst, nachdem die Zwischenprodukte durch die Einwirkung des Sauerstoffes — bei der Entwicklung des Weines durch die des Luftsauerstoffes — oxydiert worden sind. Die Bitterstoffe sind Oxydationsprodukte.“

Wenn Wortmann hiermit die Hauptrolle den Schimmelpilzen zuschreibt, so können wir uns damit nicht einverstanden erklären, weil verschiedene unumstößliche Tatsachen dagegen sprechen. Die eigentliche Bitterkrankheit ist nach Geruch und Geschmack und sonstigen Merkmalen eine so charakteristische Erscheinung, daß es möglich sein sollte, sie gesondert zu halten und davon andere Vorkommnisse, wobei der Wein auch einen etwas bitteren Beigeschmack erhält, zu trennen. Das eigentliche Bitterwerden tritt nun nach vielfachen Erfahrungen meist erst nach einigen Jahren auf, auch dann, wenn die Weine vorher zu wiederholten Malen abgezogen und dabei

mit Luft in Berührung gebracht wurden; ja nicht selten kommen die vollständig ausgebauten Weine noch gesund auf Flaschen und werden hier erst nach Jahren bitterkrank. Daß hierbei nicht etwa durch Stopfen hineingewachsene Schimmelpilze das Bitterwerden verursachen, konnten wir zu wiederholten Malen feststellen; namentlich möchten wir aber hier auf einen interessanten Versuch Pasteurs (1; p. 158) hinweisen, bei dem ein 1863 „Pomard“ im Juli 1865 in Flaschen abgefüllt wurde und zwar in vollständiger Klarheit. Von den 200 Flaschen wurden 100 erwärmt, die andern hingegen nicht; während der Wein in den ersteren unverändert blieb, entstand in den nicht erwärmten, und zwar ausnahmslos in allen Flaschen, ein starker, lockerer Bodensatz, das Bitterferment in großer Zahl enthaltend, während der Wein die Krankheit des Bitterwerdens zeigte. Es ist nun nicht wohl anzunehmen, daß in diese 100 Flaschen überall Schimmelpilze eindringen und das Bitterwerden verursachten oder daß hier ausschließlich Luft neben den Stopfen eindringen konnte, um von früheren Schimmelpilzvegetationen her vorhandene Umsetzungsprodukte zu oxydieren und zu Bitterstoffen umzuwandeln. Wenn übrigens in den Trauben und in der Rotweinmaische wuchernde Schimmelpilze das Bitterwerden zur Folge hätten, so müßte die Erscheinung viel allgemeinere Ausbreitung haben, weil Botrytis-Fäule in feuchten Herbstes so ziemlich überall auftritt. Man würde dann das eigentümliche lokalisierte Auftreten der Bitterkrankheit nicht leicht verstehen können, wohl aber ist das der Fall, sobald man annimmt, daß Bakterien die Ursache bilden, denn solche sind hinsichtlich ihrer Lebensbedingungen viel empfindlicher als Schimmelpilze, wie Botrytis, Penicillium oder Racodium cellare. Daß es bis heute nicht gelungen ist, die Krankheit durch Bakterienzusatz künstlich zu erzeugen, darf bei der großen Empfindlichkeit solcher Organismen gegen verschiedene in den Trauben und Weinen enthaltenen Stoffe nicht wohl als Gegenbeweis angeführt werden. Auch wir betrachten die ganze Frage als noch nicht abgeschlossen.

Der Buttersäurestich. Obgleich wir Gelegenheit hatten, im Laufe vieler Jahre Trauben- und Obstweine aus verschiedenen Gegenden in großer Zahl zu beobachten, ist uns doch keiner mit ausgeprägtem Buttersäurestich vorgekommen. Wir glauben aber annehmen zu dürfen, daß diese Krankheit jedenfalls nur ausnahmsweise und zwar in ganz abnormal beschaffenen Getränken auftritt. Wir neigen zu dieser Ansicht umsomehr, als bei unseren Obstweinen viele mit ganz geringem Säuregehalt sich fanden, welcher Umstand dem Auftreten von Buttersäurebakterien günstig gewesen wäre. Die Anschauung, daß beim Milchsäurestich Buttersäure entsteht, haben wir bei Besprechung dieser Krankheit schon zurückgewiesen. In der Literatur sind als das wichtigste Beispiel von Buttersäurestich Weine von der Etsch angeführt, die aus Traubensaft entstanden, deren Säure zum größten Teil durch aufgelagerten kohlensauren Kalk neutralisiert wurde (Mach und Portele 1; p. 305). Daß hier nach einer Milchsäuregärung auch noch eine wirkliche Buttersäuregärung stattfand, ergibt sich auch daraus, daß in dem Absatz der Weine neben den Milchsäurebakterien auch zahlreiche Buttersäurebakterien sich vorfanden. Es ist nun nicht ausgeschlossen, daß auch in anderen Fällen, wo der Säuregehalt eines Weines schon während oder nach der Gärung sehr herabgesetzt wurde, nach weiteren Umsetzungen durch andere Bakterien, schließlich auch durch Buttersäurebakterien

auftreten können. So haben wir gelegentlich einmal in einem weitgehend zersetzten Trub eines künstlich stark entsäuerten Weines Buttersäurebakterien mit Eigenbewegung beobachtet und auch einen an Buttersäure erinnernden Geruch des Getränkes wahrgenommen. Zwar hat Semichon (1; p. 362) den Ausdruck Buttersäuregärung für die Bitterkrankheit angewendet, gestützt auf einen einzigen schon erwähnten Nachweis von Buttersäure durch D u c l a u x. Da es sich zudem um ganz geringe Mengen handelt und den Bitterbakterien nicht der Charakter von Buttersäurebakterien zukommt, so dürfte es wohl richtiger sein, von einer solchen Bezeichnung für die Bitterkrankheit abzusehen.

Säureabbau durch Bakterien und Hefen. Schon früh hat man beobachtet, daß der Säuregehalt der Weine während und nach der Gärung abnehmen kann und es wurde diese Säureabnahme gewöhnlich der leicht zu beobachtenden *Ausscheidung von Weinstein* zugeschrieben. Wir werden uns mit dieser Art von Säureabnahme in der Folge nicht weiter zu beschäftigen haben und wollen hier nur darauf hinweisen, daß sie, wie z. B. Kulisch (1; p. 469) näher nachwies, in Wirklichkeit nur gering sein kann.

Eine zweite Art der Säureverminderung kann durch die im Wein lebende Hefe verursacht werden. Nach Kulisch haben Hefen in Nährlösungen mit Zusatz von Apfelsäure diese zersetzt, während Zitronensäure und Weinsäure unverändert blieben. Aus seiner Beobachtung, daß im Weine der Vorgang der Säureabnahme während der Nachgärung sich abspielt, erklärt er diesen als eine Tätigkeit der am Boden abgesetzten Trubhefe, welche wegen Mangel an Zucker die Extraktivstoffe und besonders Säuren angreife. Wenn Kulisch bei seinen Beobachtungen an Apfelweinen dann eine Säureabnahme bis zu 40 Proz. angibt, so waren hier, wie aus dem Späteren hervorgehen wird, nicht nur Hefen, sondern hauptsächlich Bakterien tätig, denn die durch Hefe verursachte Säureabnahme ist durchwegs eine geringe. Das zeigten auch die von Wortmann (2; p. 581ff.) gemachten Erhebungen bei verschiedenen Heferassen, die in dieser Beziehung Unterschiede erkennen ließen. Die höchste von ihm beobachtete Säureabnahme zeigte den ausnahmsweise hohen Betrag von 17,6 Proz. des ursprünglichen Säuregehaltes.

J. Schukow (1; p. 607), der das Verhalten von reingezüchteten Hefen in Nährlösungen beobachtete, konnte ebenfalls Säureverbrauch feststellen und zwar verhielten sich die verschiedenen Arten und Rassen verschieden. Die stärkste Säureabnahme wurde erzielt durch *Saccharomyces apiculatus*. Von den in Betracht kommenden Säuren wurde Zitronensäure angegriffen, etwas schwächer Apfelsäure und weit weniger Wein- und Bernsteinsäure. Auch wir (Müller-Thurgau und Osterwalder 3; p. 360, 2; p. 339) konnten bei unseren Versuchen mit reingezüchteten Hefen in Wein und Obstweinen in manchen Fällen ganz geringe Säureabnahme beobachten, in sehr vielen Fällen trat aber während der Gärung und auch nachher keine Verminderung der Gesamtsäure ein, wenn wirklich nur Hefen vorhanden waren.

Von diesen beiden Vorgängen ist streng zu trennen der eigentliche **Säureabbau durch Bakterien**. Wie wir schon im Eingang dieses Kapitels erwähnten, rechnen wir diesen Säureabbau nicht zu den Weinkrankheiten, was ja auch selbstverständlich ist, da durch diesen Vorgang der Wert des Weines oft erhöht wird. Selbst dann, wenn durch einen Säureabbau

in säurearmen Getränken die Haltbarkeit derselben vermindert wird und derselbe also in diesem Falle nachteilig wirkt, 'möchten wir ihn nicht als Krankheit auffassen. Die infolge eines zu weit gehenden Säureabbaues weiter eintretenden Vorgänge können dann allerdings den Charakter von Krankheiten aufweisen. Eine weitgehende Entsäuerung ermöglicht oft erst säureempfindlichen Bakterien das Aufkommen. Auch Fehler, wie z. B. das Schwarzwerden, können die Folge einer starken Entsäuerung sein. Den Vorgang des Säureabbaues selbst wird man daher logischerweise nur dann als Krankheit bezeichnen, wenn er direkt verbunden ist mit nachteilig wirkenden Umsetzungen, z. B. Ausscheidung des Farbstoffes oder mit der Entstehung geschmacklicher Fehler, falls der Säureabbau zu weit geht. So findet z. B. beim Umschlagen zuerst auch ein Säureabbau statt; oft schon damit in Verbindung und nachträglich werden aber durch die gleichen Bakterien Umsetzungen verursacht, die die Qualität des Weines stark beeinträchtigen. So erhält der Wein zuerst einen faden, nachträglich einen stichigen Geschmack. Ähnlich verhält es sich mit dem Milchsäurestich, bei dem gewisse Bakterien anfangs deutlich Säure abbauen, um in der Folge aus Zucker oder anderen Substanzen Milchsäure und Essigsäure zu bilden. Würde die zweite Wirkung ausbleiben, so hätten wir es nicht mit einer Krankheit zu tun. Nun gibt es aber zahlreiche Fälle, bei denen der Abbau der Säure ohne Erzeugung flüchtiger Säuren oder anderer ungünstiger Nebenprodukte erfolgt, und dieser Vorgang ist es, der im folgenden unter der Bezeichnung Säureabbau zur Besprechung kommt. Auffallenderweise finden sich in der französischen Literatur wenig Angaben über Säureabbau in diesem Sinne. Es scheint, daß man in Frankreich diese Erscheinung bis in die neueste Zeit mit dem Umschlagen zusammenfaßte. Es tritt, wie auch A. Rosenstiehl (1) andeutet, bei Rotweinen, und namentlich solchen wärmerer Gebiete, die von Anfang an säureärmer sind, der Säureabbau weniger als günstiger Einfluß hervor als bei den säurereicheren Weinen nördlicher Gegenden.

Unter den von Pasteur angeführten Beobachtungen über das Umschlagen findet sich ein Fall, den man ganz wohl als Beispiel des Säureabbaues auffassen kann (1; p. 34). Er teilt mit, daß bei einem Besitzer ein 1861er Wein schon am 14. November eine tiefgehende Veränderung erlitten habe, so daß man, wenn dies nicht durch die Verhältnisse ausgeschlossen wäre, an einen Zusatz von Wasser hätte denken können. Die von ihm und Ballard vorgenommene Untersuchung ergab, daß der fade Geschmack des Weines verursacht wurde durch einen Gärvorgang vom Charakter einer Milchsäuregärung, und Ballard sprach sich dahin aus, daß diese Erscheinung eine im südlichen Frankreich häufige sei.

In Apfelweinen hat Boussingault (1; p. 229) eine regelmäßig vorkommende starke Säureabnahme während der Gärung beobachtet, in einem Fall z. B. von 4,59 auf 2,52 g im Liter (als Schwefelsäure berechnet). Eine Erklärung für diese Erscheinung vermochte er aber nicht zu geben. Nach unserer Ansicht hatte er den eigentlichen Säureabbau durch Bakterien vor sich. Nähere Angaben über starke Säureabnahme nach abgeschlossener Gärung in Traubenweinen machte sodann Müller-Thurgau (1; p. 148). Die Säureabnahme betrug in einzelnen Fällen bis 50 Proz. und etwas darüber; in anderen Fällen blieb sie geringer. Die Jahrgänge der gleichen Gegend zeigten hierin ein etwas verschiedenes Verhalten. Auch Bodenart und Düngung hatten einen Einfluß, indem die Weine aus leichteren Böden geringere Säureabnahme zeigten als diejenigen aus schweren und Stickstoffdüngung

einen stärkeren Abbau begünstigte. Da der von ihm beschriebene Säureabbau meist erst in dem von der Hefe getrennten Weine stattfand und er „in einer Reihe von Weinen, in welchen eine beträchtliche Säureabnahme statthatte, Bakterien gefunden, zweifelte er auf Grund seiner Beobachtungen nicht daran, daß diese in manchen Fällen die Ursache der Säureabnahme sind.“ K u l i s c h (1; p. 449) beobachtete in Apfelweinen eine Säureabnahme während der Lagerung auf der Hefe nach der Gärung bis zu 40 Proz. Er glaubte diese Abnahme der Hefe (*Sacch. ellipsoideus* und *Sacch. apiculatus*) zuschreiben zu sollen, die nach dem Verschwinden des Zuckers sich der Säuren und anderer Extraktstoffe bemächtigte, weil nach dem Entfernen oder Abtöten des Trubes die Säureabnahme nicht weiter schritt. Die Säureabnahme bei Traubenweinen, die man vielfach auf die Weinsteinausscheidung während der Gärung zurückführte, kann nach seinen Darlegungen nur zum Teil diesem Vorgange zugeschrieben werden. In der Annahme, der Säureabbau in Apfelweinen werde durch Hefen verursacht, hat K u l i s c h sich wohl getäuscht, denn Säureabnahmen bis zu 40 Proz. werden durch die genannten Organismen allein nicht herbeigeführt; in dem Trub der betreffenden Apfelweine werden sich auch säureabbauende Bakterien vorgefunden haben. In Obstweinen, besonders in Apfelweinen, tritt nach unseren Beobachtungen der Säureabbau durch Bakterien regelmäßig ein.

A. K o c h (1; p. 395) beobachtete in rheinhessischen Weinen beträchtliche Säureabnahmen. Auf Grund seiner Überlegungen kam er dazu, als Ursache dieser starken Säureverluste die Anwesenheit von Bakterien anzunehmen. Eine Reihe von Versuchen bestätigte nun diese Annahme. Ein reingezüchtetes Bacterium, das er einem mit Reinhefe vergorenen und von der Hefe getrennten Weine zusetzte, vermochte allerdings keinen Säurerückgang zu verursachen. Es fehlten die erforderlichen Wachstumsbedingungen. Wurde dagegen die durch Erwärmen getöte Hefe im Wein belassen, so trat bei Zusatz des Bacteriums die Säureabnahme ein. Die tote Hefe lieferte den Bakterien die erforderliche Nahrung. Ebenso konnte ein Säurerückgang herbeigeführt werden, wenn einem mit Äpfelsäure versetzten Weine eine größere Menge reingezüchteter Bakterien zugesetzt wurde. In spontan vergorenen Weinen beobachtete K o c h Säureabnahmen bis zu 60 Proz.; in Weinen, die zuerst durch Reinhefe vergoren waren, fand durch seine Bakterien eine ebenso starke Säureabnahme statt. Er schließt sich der Ansicht M ü l l e r - T h u r g a u s an, daß Stickstoffdüngung der Reben einen starken Säureabbau im Weine begünstige, und erklärt dies durch den Nährstoffbedarf der Bakterien. Durch diese Forschungen K o c h s ist nun zum ersten Male festgestellt worden, daß der eigentliche Säureabbau durch im Weine lebende Bakterien verursacht wird. Das in Betracht kommende Bacterium hat er allerdings nicht näher beschrieben, so daß man nicht einmal weiß, ob es sich bei dem von ihm als hauptsächlich wirksam erwiesenen Organismus um einen *Micrococcus* oder um ein Bacterium handelt.

Im Jahre 1901 wiesen R. K u n z (1; p. 673) und M ö s l i n g e r (1; p. 1121) unabhängig voneinander nach, daß auch in normalen Weinen Milchsäure regelmäßig vorhanden sei, eine Beobachtung, die bei algerischen Weinen schon früher, 1896, durch A. M ü l l e r gemacht wurde. K u n z hat in gesunden Weinen z. B. 4^0_{∞} Milchsäure nachgewiesen. Als ein wesentliches Ergebnis seiner Untersuchungen mittels eines von ihm ausgearbeiteten Verfahrens zur Bestimmung der Milchsäure hebt er hervor, daß die Säure gesunder Weine regelmäßig nicht aus Äpfelsäure allein, sondern zu einem

großen Teil aus Milchsäure bestehe, ja daß der Gehalt an Äpfelsäure dem an Milchsäure erheblich nachstehe. M ö s l i n g e r, der ebenfalls das häufige Vorkommen von Milchsäure zum Teil in großen Mengen in gesunden Weinen nachwies, stellte ferner fest, daß diese Milchsäure oft schon bald nach der Gärung auftritt und mit dem Alter des Weines noch zunehmen könne. Als höchster Milchsäuregehalt in noch normalen Weinen wurde 6‰ festgestellt. Weitere Versuche ergaben ihm dann, daß in gleichem Maße, wie der Milchsäuregehalt zunimmt, der Äpfelsäuregehalt schwindet. M ö s l i n g e r kommt zu der Ansicht, daß beim Ausbau der Weine, namentlich der alkoholarmen, Milchsäure aus dem Zerfall oder der sonstigen Umsetzung der Äpfelsäure entstehe. Er unterscheidet diese Art der Milchsäurebildung von der durch Bakterien aus Zucker bewirkten, wie sie beim Milchsäurestich zustande kommt.

Weitere Klarheit in diese Verhältnisse brachten die Untersuchungen von Seifert (1; p. 9), der aus Wein mit stark abgebauter Säure einen *Micrococcus* züchtete und diesen in künstlichen Nährlösungen, z. B. Hefedekokt mit und ohne Äpfelsäure, brachte. Die Äpfelsäure wurde unter Bildung von Kohlensäure zersetzt und der Säuregehalt sank von $8,6\text{‰}$ auf $4,8\text{‰}$. Dabei wurden $4,67\text{‰}$ Milchsäure gebildet. Ebenso fand dabei eine, wenn auch nur geringe Bildung flüchtiger Säure statt. Es wurde also durch den *Micrococcus* ein glatter Zerfall der Äpfelsäure in Kohlensäure und Äthylidenmilchsäure herbeigeführt. Nach der Berechnung konnten aus der angewendeten Äpfelsäure ($8,6\text{‰}$) $4,56\text{‰}$ Milchsäure entstehen. Auf die Eigenschaften der fakultativ anaëroben Bakterie, die Seifert *Micrococcus malolacticus* nennt, werden wir später bei der Beschreibung der von uns gezüchteten Bakterien näher eintreten. Weil bei dem durch diesen Organismus verursachten glatten Zerfall der Äpfelsäure so gut wie keine Nebenprodukte entstehen, wird erklärlich, warum die in der Säure zurückgegangenen Weine vollständig rein schmecken. Der Wein, aus dem der *Micrococcus* gezüchtet wurde, war ein vollkommen gesunder und gehörte zu den besten der 1900er des Institutskellers in Klosterneuburg. Der *Micrococcus* vermag nicht zu zersetzen: Bernsteinsäure, Rechtsweinsäure, Linksweinsäure, Traubensäure, Zitronensäure, Malonsäure, Milchsäure und Essigsäure, weder bei Luftzutritt, noch bei Luftabschluß.

Die meisten Versuche wurden in künstlichen Nährlösungen angestellt; bei den Weinen verwendete Seifert, soweit aus seinen Veröffentlichungen zu ersehen ist, nicht reine Kulturen, sondern Weintrub mit dem betr. *Micrococcus*. In stickstoffarmen Weinen fand er die Entwicklung der äpfelsäurezersetzenden Bakterien und damit die Säureabnahme geringer als in stickstoffreichen. Unter den von uns kultivierten und in Abschnitt III näher beschriebenen Bakterien finden sich auch solche, die die Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure zersetzen, also ebenfalls zum eigentlichen Säureabbau in Weinen befähigt sind. Wir haben diesen Vorgang sowohl in Obst- als in Traubenweinen näher verfolgt und konnten durch Zusatz von Reinkulturen zum klaren Wein ohne Trub den Säureabbau künstlich herbeiführen. Näheres enthält der betreffende Abschnitt.

Kapitel II.

Reinzüchtung und Kultur von Weinbakterien.

Durch die von Robert Koch geschaffene Methode, Bakterien in festen Nährböden zu züchten und die dadurch gegebene Möglichkeit, sie zu isolieren und auf verhältnismäßig einfachem Wege Reinkulturen herzustellen, wurde auch die Untersuchung der Weinbakterien naturgemäß in hohem Grade gefördert. Während die früheren Beobachtungen und Versuche sich auf Gemische verschiedener Bakterien bezogen, oder doch wenigstens keine Sicherheit boten, daß man es mit einem einzigen Organismus zu tun hatte, so war durch die Kochsche Methode die Sachlage auf einen Schlag verändert und es verdienen von den späteren Arbeiten nur noch solche wissenschaftliche Berücksichtigung, die hierauf Rücksicht nahmen. Wenn auch die Pasteurschen Untersuchungen mit großer Sorgfalt und Scharfsinn durchgeführt wurden, und unsere Kenntnisse der Weinkrankheiten in hohem Maße förderten, so ist es doch zu bedauern, daß ihm diese Methode noch nicht zur Verfügung stand. Er hätte sich gewiß derselben sofort bedient; sie hätte seine Forschungen erleichtert und ihren Ergebnissen einen höheren Grad der Sicherheit verliehen.

Im Nachfolgenden gedenken wir nicht, die Züchtungsmethode sämtlicher Forscher auf diesem Gebiete erschöpfend anzuführen, sondern nur das Wesentliche hervorzuheben.

E. Kramer (1; p. 135) verwendete zur Reinzucht seiner Bakterien aus kranken Weinen als festen Nährboden Gelatine mit Fleischbrühe, Pepton und Kochsalz als Zusatz. Bei Gayon und Dubourg (2; p. 532) finden wir keine Angabe, wie sie die Mannitbakterien isoliert haben, dagegen genauere Mitteilung der verwendeten Kulturflüssigkeit, meist 20–30 g Liebig'scher Fleischextrakt mit verschiedenen Zuckerarten pro Liter, oder Hefewasser, hergestellt aus 200–250 g Preßhefe auf einen Liter Wasser, oder auch verdünnten Traubensaft.

A. Koch (1), der in seiner Mitteilung über die Ursache des Verschwindens der Säure bei Gärung und Lagerung des Weines von Reinkulturen der säureverzehrenden Bakterien spricht, gibt leider nicht an, wie er sie isoliert hat, wie ja auch Angaben über das Äußere dieser Bakterien vollständig fehlen. Zu den Versuchskulturen verwendete er sodann Bouillon mit Äpfelsäure.

W. Seifert (1; p. 8) isolierte seinen bekannten *Micrococcus malolacticus* aus einem Weintrub durch Verwendung von Nährgelatine. Als Medium für die weitere Kultur benutzte er Hefedekokt mit und ohne Äpfelsäure, nicht aber Wein. Laborde (1; p. 3 u. 4) hat zu seinen Plattenkulturen, durch die er die Organismen des umgeschlagenen und bitteren Weines isolierte, Gelatine mit Weinextrakt und etwas Zucker verwendet, zur weiteren Kultur Traubensaft sowie verdünnten Traubensaft mit Hefeauszug. Mazé und Paccottet (1; p. 462) züchteten eine Reihe von Bakterien aus kranken Weinen verschiedener Art; da sie bei direkter Verwendung des Weintrubes aus alten Flaschenweinen zu Plattenkulturen mit verschiedenen beschaffenen Nährböden keine Kolonien erhielten, so nahmen sie an, die darin enthaltenen Bakterien seien anaerob. Um zum Ziel zu gelangen, d. h. um etwa noch lebende Organismen zu gewinnen, brachten sie den Trub zunächst in sauerstofffreie Medien (Bohnenauszug mit 3 Proz. Saccharose, neutral oder schwach angesäuert) und geeignete Glasröhrchen (Pipette Roux), die nach vollständiger Entfernung der Luft zugeschmolzen wurden. Hier bildete sich

nun nach einigen Wochen oder einigen Monaten ein Depot neu gewachsener Bakterien, die, in gleiche Verhältnisse übertragen, eine noch schnellere Entwicklung zeigten, und nun auch zum Wachstum bei Luftzutritt, in offenen Röhrchen, befähigt waren. Erst nach diesen Vorkulturen mit Anreicherung von vielleicht ursprünglich ganz vereinzelter Bakterien, schritten sie zur Isolierung durch Plattenkultur mit Gelatine und Bohnenauszug. Als Nährlösung für die weiteren Kulturen wählten sie dann neutralen Bohnenauszug mit verschiedenen Zuckerarten. Kayser und Manceau (1; p. 19) verfahren bei der Heranzucht ihrer Bakterien des Zähwerdens in der Weise, daß sie, von einem zähen Wein ausgehend, in ununterbrochen fortgesetzten anaëroben Kulturen, teils in festen, teils in flüssigen Nährböden alle anderen Organismen eliminierten. Sie geben an, daß es nicht möglich sei, auf anderem Wege zum Ziele zu gelangen (p. 20). Als flüssiges Kulturmittel verwendeten sie Malztresterauszug (Eau de touraillons), Hefeauszug, Bohnenauszug, entsäuerten Traubensaft, wobei sie das erste für das beste halten. Für einzelne Bakterien erwies sich folgende künstliche Nährlösung sehr geeignet:

in einem Liter Wasser	10	g	Lävulose
	10	g	Pepton
	0,5	g	Dikaliumphosphat
	0,1	g	Magnesiumsulfat.

Schon von Mitte der 90er Jahre an züchteten wir zunächst aus kranken Obstweinen und später aus kranken Traubenweinen verschiedene Bakterien. Als festen Nährboden zur Isolierung benutzten wir dabei stets Gelatine oder Agar-Agar mit mildem säurearmem Birnsaft oder entsäuertem Traubensaft und als Kulturflüssigkeit Birnsäfte verschiedener Art, hauptsächlich von gut ausgereiften Theilersbirnen und Schweizer Wasserbirnen und stark entsäuerten Traubensaft (von G u t e d e l). In den letzten 10 Jahren wurde dann, um ein kräftiges Wachstum der Bakterien zu erzielen, meist Hefeauszug (100 g Preßhefe auf einen Liter) verwendet mit Zusatz von ca. 1‰ Äpfelsäure oder Weinsäure und 2—3 Proz. Rohrzucker, Lävulose oder Dextrose. Bei der Isolierung verfahren wir in der Weise, daß der flüssigen Nährgelatine Trub von kranken Weinen oder Obstweinen in verschiedenen Mengen zugesetzt wurde. Aus der Plattenkultur mit entsprechend geringer Zahl von Kolonien wurden einzelne der letzteren nach mikroskopischer Besichtigung herausgenommen und unter Anwendung der notwendigen bakteriologischen Kautelen ein Teil der Kolonie in die Kulturflüssigkeit übertragen. Wenn auch schon dieses Verfahren, wie wir uns durch das übereinstimmende Verhalten der so reingezüchteten Bakterien bei den fortgesetzten Kulturen sowohl in morphologischer als physiologischer Beziehung überzeugen konnten, wirkliche Reinkulturen ergab, so suchten wir doch die Sicherheit desselben noch in der Weise zu steigern, daß das aus einer isolierten Kolonie entstandene Bakteriendepot nochmals zur Herstellung von Plattenkulturen verwendet wurde. Dieses verhältnismäßig einfache Verfahren dürfte vielleicht nicht genügen bei Bakterien, die in neutralen Böden gezüchtet werden, weil hier die Gefahr einer Verunreinigung der Kulturen weitaus größer ist als bei der Verwendung von sauren Nährböden. Letztere sind aber bei Weinbakterien verwendbar, und gestatten die große Mehrzahl von Bakterien, denen das Wachstum hier unmöglich ist, auszuschließen, während Infektionen von Spore- und Schimmelpilzen, die etwa stattfinden könnten, der Geübte leicht vorbeugen kann. Nachdem B u r r i (1) ein Verfahren ausgearbeitet hat, das bei der Isolierung von Bakterien noch größere Sicherheit gewährt, indem

man von einer vorher sicher konstatierten Einzelzelle ausgehen kann, wird bei weiteren Arbeiten über Weinbakterien diese Methode vielleicht mit Vorteil herbeigezogen.

Mit dem Säure- und Alkoholgehalt und der sonstigen chemischen Beschaffenheit der Weine und Obstweine mag es dann auch zusammenhängen, daß man in kranken Weinen keine mannigfaltige Bakterienflora trifft. Von den verhältnismäßig wenig Bakterien, die in diesen Getränken die Bedingungen des Fortkommens finden, tritt dann oft nur die eine oder andere Art auf und so erscheint nicht selten der Trub eines kranken Weines wie eine Reinkultur. Doch wird man sich hüten müssen, eine solche ohne weiteres anzunehmen, denn die Beobachtung zeigt, daß, wenn ein Bacterium die Beschaffenheit des Weines, z. B. eines Flaschenweines, verändert hat, ein anderes zur Geltung gelangen kann, das, wenn auch in geringer Zahl, vorher doch schon vorhanden gewesen sein muß. Wir sind bei der Isolierung der Weinbakterien gewöhnlich in der Weise verfahren, daß wir streng anaerobe Bakterien, sofern sie vorhanden waren, in der Kultur wahrscheinlich nicht gefunden haben. In den wenigen Fällen, wo auch anaeroben Bakterien das Wachstum ermöglicht wurde, haben wir keine anderen Organismen gefunden als bei den parallel damit ausgeführten Plattenkulturen mit Luftzutritt. Das schließt aber nicht aus, daß in gewissen Fällen durch ein Kulturverfahren mit vollständigem Sauerstoffausschluß auch streng anaerobe Bakterien gefunden werden können.

Die Aufbewahrung der reinkultivierten Bakterien kann zweckmäßig wohl in der Weise stattfinden, wie bei den Hefen, auf festen Nährböden als Strich- oder Stichkultur, oder in Nährflüssigkeiten, wie z. B. milden Obstsäften, entsäuerten Traubensäften und in Hefeauszug mit Zucker. Ob auch bei den Bakterien bei Übertragung in reine 10-proz. Saccharoselösung ähnlich wie bei den Reinhefen eine längere Lebensfähigkeit erzielt werden kann, müßte erst durch Versuche nachgewiesen werden. Wir verwenden zur Aufbewahrung meistens Kulturflüssigkeiten und zwar solche, in denen die betreffenden Organismen gut gedeihen. Milde Birnsäfte und der oben beschriebene Hefeauszug mit 2—3 Proz. Rohrzucker und Aufbewahrung in kühlen, trockenen Räumen haben uns gute Dienste geleistet. Nach erfolgtem Wachstum nimmt allerdings auch in den günstigen Medien die Zahl der lebenden Individuen allmählich ab, so daß bei Überimpfung älterer Kulturen es längerer Zeit bedarf, bis man wieder lebhafte Entwicklung erzielt, während bei Aussaat junger die neue Kultur innerhalb wenigen Wochen auf voller Höhe steht. Bei Verwendung von Obstsäften und Hefeauszug pflegen wir darum gewöhnlich je nach 2 Monaten eine Übertragung der Kulturen in frische Nährflüssigkeit vorzunehmen. Übrigens wäre es fehlerhaft, hier zu verallgemeinern, indem die verschiedenen Arten schon in ihrer Entwicklung und dann auch in der Erhaltung ihrer Lebensfähigkeit Unterschiede aufweisen.

Kapitel III.

Untersuchungen über 4 von uns reingezüchtete Weinbakterienarten. Morphologie, Physiologie und Systematik.

Die derzeitige Kenntnis von den die Weinkrankheiten und den Säureabbau verursachenden Bakterien ist noch durchaus ungenügend, wie schon aus der vorstehenden Zusammenstellung der früheren Untersuchungsergebnisse zu erkennen ist. Dem entspricht dann auch die Unsicherheit in der Beurteilung

der betreffenden Vorgänge im Wein, namentlich auch hinsichtlich der Rolle, die die Bakterien dabei spielen. Hier sind ohne Zweifel noch bedeutende Lücken unseres Wissens auszufüllen und wir haben daher schon vor Jahren begonnen, Bakterien verschiedener Art aus Weinen und Obstweinen zu gewinnen, rein zu züchten und auf ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften zu prüfen. Wohl sind wir noch lange nicht am vorgesteckten Ziele angelangt; allein die Ergebnisse haben sich so angehäuft, daß wir es für geboten halten, sie zu veröffentlichen. Unter den 15 von uns reingezüchteten Bakterien, von denen übrigens nicht alle in gleich eingehender Weise studiert wurden, zeigen einzelne ziemliche Übereinstimmung miteinander, so daß wir die Bakterien in 3 Gruppen anordnen möchten, deren Vertreter sich sowohl in morphologischer, als auch in physiologischer Hinsicht unterscheiden. Als Hauptvertreter der 5 in die 1. Gruppe gehörenden Bakterien führen wir das bereits beschriebene *Bacterium mannitopæum* an (Müller-Thurgau 6; p. 463); die Bakterien sind ausgeprägte Milchsäurebakterien und bilden in Gegenwart von Lävulose rasch große Mengen von Mannit, während sie die organischen Säuren weniger leicht angreifen als die übrigen. In diese Gruppe würde auch das Mannitbacterium von Gayon und Dubourg (1 u. 2) einzuordnen sein.

Für die zweite Hauptgruppe mit 5 Repräsentanten, kann das ebenfalls schon beschriebene *Bacterium gracile* (Müller-Thurgau 6; p. 464) als Typus aufgestellt werden. Sie gehören ebenfalls zu den Milchsäurebakterien, die in Lävuloselösung Mannit bilden, allein im Bau sind sie bedeutend zarter als die der ersten Gruppe; sie wirken auch in der angegebenen Richtung weniger kräftig. Dafür besitzen sie eine ausgeprägte Fähigkeit, Äpfelsäure und Zitronensäure zu zerlegen.

Während die Vertreter der ersten 2 Gruppen stäbchen- und fadenbildende Bakterien sind, gehören die der dritten Gruppe zu den Mikrokokken. Als Hauptvertreter dieser Gruppe führen wir im Nachfolgenden *Micrococcus acidovorax* und *Micr. variococcus* an. Sie sind Milchsäurebildner, z. T. sogar sehr kräftige; dagegen geht ihnen die Fähigkeit, aus Lävulose Mannit zu bilden, ab; ferner zeichnen sie sich durch einen energischen Abbau der Äpfelsäure aus und stimmen hierin mit den Vertretern der 2. Gruppe überein.

I.

Gruppe des *Bacterium mannitopæum*.

A. Morphologisches Verhalten.

Hierher gehören die von uns als f, k, p, q, t bezeichneten Bakterien, von denen nur t aus Traubenwein und zwar aus einem Weißwein der Sorte „Gutedel“ gezüchtet wurde, worin es spontan aufgetreten war, während man die andern 4 aus milchsäurestichigen Obstweinen gewonnen hatte. f, das zuerst und am meisten untersuchte, erhielt den Speziesnamen *Bacterium mannitopæum* f, während wir die übrigen als *Bacterium mannitopæum* k, p, q, t bezeichnen. Da das Längen- und Dickenwachstum der Bakterien, sowie deren Gliederung in verschiedenen Nährmedien beträchtliche Abweichungen zeigen, so genügt es nicht, wenn in Bakterienbeschreibungen nur das Verhalten in einem Medium als Maßstab angegeben wird. Wir suchten diesen Fehler zu vermeiden, indem wir Beobachtungen über Wachstum, Teilung und Größenverhältnisse in verschiedenen

Nährmedien anstellten, so in einem teilweise entsäuerten Weißwein (Gutedel), dem man ca. 7 Proz. eines unvergorenen Saftes der gleichen Sorte zufügte, so daß derselbe noch ca. 1,7 Proz. Gesamtzucker aufwies, ferner in Nährgelatine und zwar sowohl in Oberflächenkolonien als auch in den Tiefenkolonien und endlich in Hefeauszug mit Lävulose.

Die verwendete Nährgelatine wurde hergestellt, indem man 15-proz. Gelatine ca. 7 Proz. eines milden Theilersbirnsaftes zusetzte. Zur Messung und Herstellung der Abbildung wurden die Bakterien in üblicher Weise fixiert, gefärbt und in Kanadabalsam eingebettet. *Bacterium mannitolpæum f* bildet bei der Kultur in Gutedelwein längere und kürzere Fäden, die mit wenig Ausnahmen nicht in Kurzstäbchen eingeteilt sind; die Fäden sind 0,6—0,75 μ dick (Taf. I, Fig. 1). In Gelatine-Tiefenkolonien bildet das gleiche Bacterium meist nur ganz kurze Stäbchen von c. 1,5 μ Länge und 0,75—1,15 μ Dicke und nur ausnahmsweise einen längeren Faden (Taf. I, Fig. 2). Die Stäbchenbakterien einer Oberflächenkolonie, die man, um die Wachstumsformen zu beobachten, zu einer Riesenkolonie sich ausbilden ließ, fanden sich fast ausschließlich in Form von Stäbchen mit abgerundeten Enden und zwar besaßen dieselben wieder die Länge von 1,5 μ . Dagegen waren sie sichtlich dünner, 0,5—0,75 μ , sie sind also durchwegs dünner als in den Tiefenkolonien; möglicherweise hängt dies zusammen mit dem größeren Alter der Kolonie, einer stärkeren Verarmung des Nährmediums, Anhäufung von Umsetzungsprodukten und vermutlich auch mit einem Austrocknen der Gelatine.

Bacterium mannitolpæum k. In Gutedelwein finden sich die Bakterien in Form von Fäden, die aber nicht gerade, sondern mehr gebogen, geknickt und oft in Kurzglieder geteilt sind; Dicke 0,6—0,7 μ . In der Gelatine bildet auch dieses Bacterium in der Regel nur Kurzstäbchen und nur selten einen längeren Faden, der gewöhnlich nicht eingeteilt ist. Dicke der Stäbchen 0,7—0,8 μ . In den Riesenkolonien waren die Kurzstäbchen 0,9 μ dick.

Bacterium mannitolpæum p. In Gutedelwein bildet auch dieses Bacterium längere und kürzere Fäden, letztere in der Mehrzahl, die fast alle uneingeteilt sind. Sie sind 1 μ dick, merklich dicker als *Bacterium mannitolpæum f*. In Gelatine wiederum finden sich durchwegs Kurzstäbchen, hie und da einige zu einer kurzen Kette vereinigt; durchschnittliche Dicke derselben 0,75 μ . In den Riesenkolonien fanden sich gelegentlich zwischen den Kurzstäbchen längere uneingeteilte Fäden. Die durchschnittliche Dicke der Stäbchen beträgt hier 0,75 μ .

Bacterium mannitolpæum t ist entschieden robuster als die übrigen. In Gutedelwein, wo sich Stäbchen, kürzere und längere Fäden fanden, zeigten dieselben eine durchschnittliche Dicke von 1,15—1,3 μ ; einzelne Stäbchen erreichten sogar die Dicke von 1,5 μ . In den Tiefenkolonien der Gelatine waren wiederum die Kurzstäbchen vorherrschend. Daneben fanden sich auch vereinzelte nicht eingeteilte Fäden. Die größte Dicke betrug 1,1 μ . In den Riesenkolonien waren die Bakterien ungefähr gleich gestaltet; nur zeigten sie sich, vielleicht aus den schon erwähnten Gründen, dünner, durchschnittlich 0,75 μ dick.

Obgleich die Größenverhältnisse der einzelnen Individuen bei den vorgenannten Bakterien gewisse Schwankungen zeigen und naturgemäß auch von den Ernährungsverhältnissen abhängen, so ergibt ein genaueres Studium doch, daß wir es bei den zu dieser Gruppe vereinigten Organismen nicht immer mit dem gleichen Bacterium zu tun haben und daß sich gewisse kon-

stante Verschiedenheiten zeigen, so daß wir dieselben, wenn wir auch noch die physiologischen Unterschiede berücksichtigen, ganz wohl als Rassen betrachten können. Unter diesen ist *t* entschieden das kräftigst gebaute Bacterium; dann folgt in dieser Beziehung *p*, während *f* und *k* etwas zarter sind. *q* wurde nur bei einem Teile der Versuche verwendet und ging dann verloren. Zur Charakteristik des *Bacterium mannito pœum* gehört noch die Bemerkung, daß die Kurzstäbchen durchschnittlich eine Länge von 1,5 μ erreichen, hie und da aber auch noch kürzer sind und in diesem Falle, namentlich wenn es sich um dicke Stäbchen handelt, kokkenähnliche Gestalt annehmen können, welcher Eindruck noch dadurch verstärkt wird, daß die Enden abgerundet sind. So fanden sich z. B. von *t* im Gutedelwein zahlreiche Kurzstäbchen von 1,5 μ Länge und 1,2 μ Dicke.

Von den Kulturen auf festen Nährböden mögen hier die Tiefenkolonien in Nährgelatine (Zusammensetzung wie schon angegeben) kurze Beschreibung finden. Bei den 4 näher studierten Rassen von *Bacterium mannito pœum* stimmen diese im ganzen überein. Da die Kolonien infolge der Aussaat aus flüssigem Nährmedium meist aus kürzeren oder längeren Fäden entstehen, sind sie in ihrer Jugend aus einer Anzahl Einzelkolonien zusammengesetzt, indem offenbar jedes Einzelstäbchen eines Fadens für sich eine kleine Kolonie bildet. Die so zusammengesetzten Kolonien erhalten deshalb oft ein eigentümlich wurmartiges Aussehen (Taf. II, Fig. 23). Bei der weiteren Entwicklung verschmelzen dann die Einzelkolonien immer mehr miteinander. Das Ganze rundet sich ab, erreicht aber doch in der Regel nicht vollständige Kugelgestalt. Neben rundlichen (Taf. II, Fig. 21 u. 22) finden sich hie und da auch linsenförmige Kolonien. Je nach der Zahl der Kolonien in den Kulturschalen ist auch ihre Größe verschieden. Bei Verwendung von 10 ccm Nährgelatine pro Schale erreichten diese bei *t* z. B. bei Anwesenheit von ca. 200 Kolonien nach 3 Wochen bei Zimmertemperatur folgende Maße: 363 μ breit und 422 μ lang, oder bei einer linsenförmigen Kolonie 349 μ breit und 465 μ lang. In der Jugend besitzen die Kolonien im durchfallenden Licht eine hellgelbliche bis bräunliche Färbung; mit zunehmender Dicke werden sie dunkler und lassen jene Färbung nur noch am Rande erkennen, während sie in der Mitte dunkelbraun bis vollständig dunkel sind. Im auffallenden Licht erscheinen alle Kolonien weiß. Solange sie durchscheinend sind, läßt sich eine körnige bis fädige Struktur erkennen. Am Rande sind sie glatt; bei großen alten Kolonien findet man in der nächsten Umgebung kurze nadelförmige kristallähnliche Gebilde, mit ihrer Achse zur Kolonie tangential verlaufend. Finden sich solche Kolonien z. B. mit Kolonien verschiedener Hefearten zusammen, so ähneln sie denen von *Saccharomyces apiculatus*. Die Kolonien dieser Bakterien verflüssigen die Gelatine ihrer Umgebung nicht, selbst dann nicht, wenn sie Gelegenheit haben, sich stark zu entwickeln. Auch findet, wenigstens bei den von uns verwendeten Nährböden keine Braunfärbung der umgebenden Gelatine statt. Unter sich zeigen die verschiedenen hierher gehörigen Bakterienrassen insofern einen Unterschied, als die Tiefenkolonien von *t* sich rascher und stärker entwickeln als die der übrigen.

Die Oberflächekolonien unterscheiden sich wesentlich von den Tiefenkolonien. Von der Stelle, wo eine Kolonie an die Oberfläche gelangt, breiten sich die Bakterien auf dieser nach allen Seiten gleichmäßig aus. Der Rand ist, wie die Abbildung (Taf. II, Fig. 9) deutlich zeigt, vielfach gebuchtet, gelappt und gewellt. Die einzelnen Lappen teilen sich wieder in kleinere, die

schließlich in einzelne fadenförmige Bündel auslaufen. Auf der ganzen Oberfläche ist eine fädige Struktur zu erkennen, wobei die einzelnen Fasern gewellt erscheinen. Der Durchmesser dieser Oberflächenkolonien ist bedeutend größer als derjenige gleich alter Tiefenkolonien. Im speziellen Fall bei *t* war der Durchmesser 1300 μ gegenüber ca. 400 μ bei den Tiefenkolonien.

Ähnlich, wie es beim Studium der Hefen üblich ist, ließ man diese Bakterien auch zu sogenannten Riesenkolonien sich entwickeln, in der Weise, daß man auf der Oberfläche von in Petri-Schalen erstarrter Nährgelatine mittels einer Glaskapillare ein Tröpfchen einer frischen Bakterienkultur in Obstsaft auftrug. Im Laufe von ca. 10 Wochen entwickelten sich daraus Kolonien von ca. 3–10 mm Durchmesser, die nun deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Rassen erkennen ließen. Die größte Ausdehnung erreichten diese Kolonien bei *t*; sie bestehen aus einer mittleren Partie mit ca. 3–4 mm Durchmesser (Taf. II, Fig. 12), wo die Bakterien eine dichtere und daher weiß erscheinende Schicht bilden, und einer Randpartie, die dünner und daher durchscheinend und unregelmäßig gebuchtet ist. Unter dem Mikroskop sieht man in dieser Partie deutlich aus Fäden gebildete Bündel, die einen welligen Verlauf zeigen und gegen die Peripherie hin in einzelne Fäden auslaufen, also stark an die schon beschriebenen Oberflächenkolonien erinnern.

In der äußeren Beschaffenheit schließt sich *k* am meisten an *t* an (Taf. II, Fig. 14); auch hier findet sich eine zentrale dichtere, weiß erscheinende Partie von ca. 3–4 mm Durchmesser; die Randpartie ist aber viel weniger entwickelt; sie erscheint nur als ein schmaler, durchscheinender, zarter, zerrissener Rand, ca. $\frac{1}{2}$ mm breit, der im übrigen gleich beschaffen ist wie bei *t*.

Eine noch schmalere Randpartie besitzen die Kolonien von *p* (Taf. II, Fig. 15). Zentrale Partie wie Randpartie sind sonst gleich beschaffen, nur ist letztere ganz schmal und streckenweise für das bloße Auge gar nicht sichtbar. Unter dem Mikroskop sieht man aber doch die Ausstrahlung des Randes in gewellte, hin und her gewundene Bündel und Fäden.

Ziemlich abweichend verhalten sich die Kolonien von *f* (Taf. II, Fig. 13). Von einer faserigen, durchscheinenden Randpartie ist makroskopisch nichts zu sehen. Die ganze Kolonie ist etwa so groß wie die zentrale Partie bei den übrigen. Sie besteht aus einer größeren Zahl weißer, abgegrenzter Höcker, größeren oder kleineren kugeligen Einzelkolonien, die durch Fäden an der Basis miteinander verbunden sind. Die größten Einzelkolonien finden sich an der Peripherie der Riesenkolonie. Diese hat daher ein warzenartiges, grobkörniges Aussehen und scheint von einem Wall umgeben.

Als Substrat für die Strichkulturen wurde Gelatine mit Hefeauszug verwendet, in schräg erstarrter Schicht in Reagenzgläsern mit Watterverschluß. Nach ca. 6 Wochen hatten die Striche in einem ziemlich kühlen Raum eine gute Ausbildung erreicht. Sie erschienen als dünne zarte Schicht auf der Gelatine; bei auffallendem Licht zeigen die oberen Partien der Striche auf dunklem Hintergrund von hinten gesehen einen bläulichen Schimmer; sie opaleszieren schwach. Die Striche weisen im Aussehen, namentlich bezüglich Zartheit, Ähnlichkeit mit gewissen *Saccharomyces apiculatus*-Rassen auf. Von den 4 Bakterien haben *t* und *f* die kräftigsten Striche entwickelt. Nirgends konnte man eine Verflüssigung der Nährgelatine wahrnehmen.

Stichkulturen wurden gleichzeitig ebenfalls in dieser Nährgelatine mit Hefeauszug angelegt und auch während der nämlichen Zeit beobachtet.

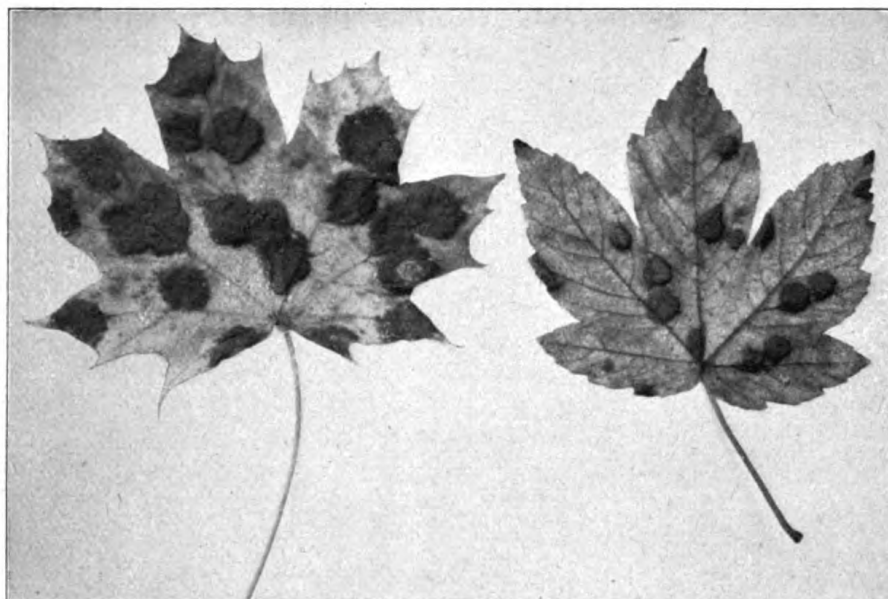


Fig. 3.

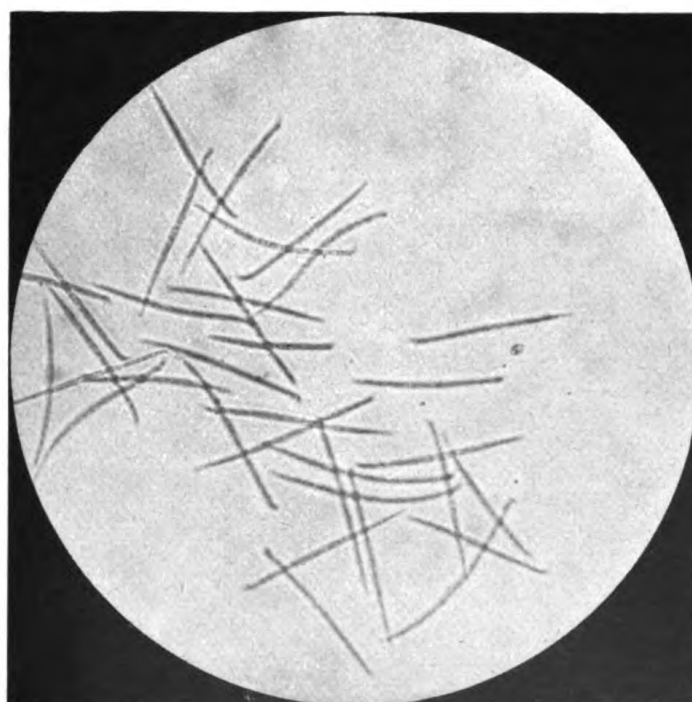


Fig. 4.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Im allgemeinen wuchsen die Bakterien in der Tiefe des Stiches, der 5½ cm tief ging, gleich gut wie oben; oben war die Stichkultur zusammenhängend, unten, wo wohl weniger Bakterien zur Aussaat gelangten, in Einzelkolonien perlschnurartig aufgelöst. t zeigte das kräftigste Wachstum, dann folgte p, hierauf f und k. Auch hier trat keine Verflüssigung der Gelatine ein.

Bei der Kultur in flüssigen Nährmedien waren p und f in der Schnelligkeit der Entwicklung den anderen deutlich überlegen. Alle 4 Rassen sind übrigens unter günstigen Umständen sehr kräftig wachsende Bakterien und vermögen in kurzer Zeit (ca. 2—3 Wochen bei Zimmertemperatur) ein starkes weißes Depot zu bilden. Schon bald nach der Aussaat beginnt die Nährflüssigkeit sich zu trüben, weil die Bakterien in großer Menge in der Flüssigkeit ausgebreitet sind; nach ca. 14 Tagen setzen sich die Bakterien ab, so daß in der Flüssigkeit von oben her, immer tiefer gehend, vollständige Klärung eintritt. Trotzdem diese Bakterien in den verschiedenartigsten Medien gezüchtet und beobachtet wurden, konnten wir niemals Sporen feststellen; ebenso wurde auch nie Eigenbewegung beobachtet. Bezüglich der Gramschen Färbung verhielten sie sich positiv. Bezüglich der Wachstumsformen in Obstsäften und Weinen sei auf den Abschnitt verwiesen, in dem die chemischen Umsetzungen in diesen Flüssigkeiten mitgeteilt werden.

B. Physiologisches Verhalten der Bakterien.

Bei unseren anfänglichen Versuchen verwendeten wir zum Studium der physiologischen Eigenschaften gewisse Obstsäfte, in denen nach unserer Erfahrung diese Bakterien gut gedeihen. Allein wir waren uns klar darüber, daß dieses Medium nicht über alle Fragen Aufschluß geben konnte und überhaupt bei der Beurteilung der Versuchsergebnisse Schwierigkeiten entstanden, weil eben Obstsäfte sehr verschieden zusammengesetzte Flüssigkeiten sind, von denen wir nicht einmal sämtliche Bestandteile kennen und manche der bekannten nicht quantitativ bestimmen können. Dennoch haben wir die Versuche in Obst- und auch in Traubensäften fortgesetzt, weil eben die dabei stattfindenden Umsetzungen im Verhalten dieser Säfte und der daraus entstehenden Weine in der Technik manches aufzuklären imstande sind. Um aber die physiologischen Eigenschaften der Bakterien genau zu studieren, mußte zu anderen Flüssigkeiten gegriffen werden. Der Versuch, Lösungen aus Stoffen ganz bekannter Zusammensetzung (künstliche Nährlösungen) zu verwenden, führte nicht zum Ziel, weil die Bakterien nicht oder nur spärlich gedeihen. In folgender Lösung fand z. B. gar kein bemerkbares Wachstum statt.

Auf 1 Liter Leitungswasser	3 g Äpfelsäure
	10 g Asparagin
	0,4 g Magnesiumsulfat
	2 g Dikaliumphosphat
	2 g Chlornatrium
	40 g Lävulose.

Einige Bakterien aus dieser und den anderen Gruppen zeigten einiges Gedeihen in der nach folgender Vorschrift hergestellten Lösung: Auf 10 l gekochtes und filtrierte Leitungswasser 10 g Pepton W i t t e, 1 g Dikaliumphosphat, 0,2 g Magnesiumsulfat, 0,2 g Chlorcalcium, 1 g Äpfelsäure und 20 g Lävulose. Diese Lösung wurde fraktioniert sterilisiert und in einer Kulturreihe direkt verwendet; in einer anderen fügte man noch 1% äpfelsaures Kalium hinzu. Hieran schlossen sich auch noch Kulturen in ähnlich

zusammengesetzten Lösungen, allein da die Bakterien darin nicht gediehen, beschränken wir uns auf die Anführung der mit den beiden ersterwähnten Lösungen erzielten Resultate. Zur Aussaat kam *Bacterium mannito pœum f.*

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g pro l	Flüchtige Säure als Essigsäure g pro l	Milchsäure g pro l
Nährlösung allein, steril	0,47	0,11	0,68
„ „ + Bact. f	1,47	0,62	0,90
„ „ + äpfelsaures Kalium, steril	0,47	0,19	0,54
„ „ + äpfelsaures Kalium + Bact. f	1,88	0,56	1,35

Das *Bacterium mannito pœum f* vermochte in diesen Lösungen den Säuregehalt zu erhöhen und zwar sowohl den Gehalt an flüchtiger Säure als an Milchsäure. In beiden Kulturflüssigkeiten war Lävulose enthalten und aus dieser sind die genannten Säuren gebildet worden. Da in der zweiten Lösung eine größere Menge von Milchsäure entstand, so könnte man den Schluß ziehen, daß das Bacterium auch aus äpfelsaurem Kalium etwas Milchsäure bildet. Allein spätere Versuche haben gezeigt, daß dieses Bacterium das äpfelsaure Kalium nicht angreift. Die etwas vermehrte Milchsäurebildung ist daher wohl auf das bessere Gedeihen der Bakterien zurückzuführen. Die Bakterien bildeten ein weißes Depot, bestehend aus kurzen und langen Fäden, von 1—1,1 μ Dicke und aus Haufen von Kurzstäbchen. Wie das Wachstum, so verliefen auch die chemischen Umsetzungen während der zweimonatlichen Versuchsdauer nur sehr langsam und erreichten keinen befriedigenden Abschluß. Man wählte daher für die weiteren Versuche Nährlösungen, deren Grundlage Hefeauszug war, obgleich zugegeben werden muß, daß damit eine Substanz in die Lösung kommt, deren Zusammensetzung nicht bekannt ist. Dafür boten diese Lösungen den Vorteil, daß die Bakterien darin gut gediehen und die dem Hefeauszug zugefügten Substanzen in verhältnismäßig kurzer Zeit tiefgreifende Zersetzungen erlitten. Die Resultate wurden durch die aus dem Hefeauszug selbst entstehenden Zersetzungsprodukte, wie aus den Versuchen zu ersehen ist, nur wenig beeinflusst.

1. Verhalten von *Bacterium mannito pœum f* gegenüber den Hexosen: Dextrose, Lävulose und Galaktose.

Im Nachfolgenden sollen zunächst die Versuchsanstellung und die Methoden zur Bestimmung der Gärprodukte besprochen werden, was nicht nur für die angeführten, sondern auch für die weiterhin verwendeten Substanzen und für die übrigen Bakteriengruppen Gültigkeit haben soll.

Herrn H. Haller, der uns bei der Ausführung dieser Arbeiten in gewissenhaftester Weise unterstützte, sei auch hier der gebührende Dank ausgesprochen.

Um den physiologischen Charakter der verschiedenen von uns gezüchteten Bakterien zu erforschen, wurde ihr Verhalten gegenüber den verschiedenen Zuckerarten, einzelnen Pentosen und Glukosiden, sowie auch gegenüber den bei Weinen besonders in Betracht kommenden organischen Säuren und

deren Salzen eingehend untersucht, ebenso später das Verhalten der Bakterien gegenüber einem verschiedenen Gehalt der Nährlösungen an Säure und Alkohol sowie auch gegenüber verschiedenen Temperaturen. Zum Schluß prüfte man dann noch diese Organismen auf ihr Gedeihen und ihre Tätigkeit in unvergorenen Obst- und Traubensäften, sowie in vergorenen Weinen mit und ohne Zuckerzusatz. Zu den erstangeführten Versuchen wählten wir von den ersten 2 Bakteriengruppen nur je einen Vertreter, *Bacterium manniotopœum* f und *Bacterium gracile* a; von der dritten Gruppe dagegen *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus*, weil diese sich stärker voneinander unterscheiden, als die Vertreter jeder anderen Gruppe unter sich. Bei den Versuchen mit unvergorenen Säften und mit Weinen wurden auch die übrigen Bakterien zum Vergleich herangezogen.

Es wurde gewöhnlich in der Weise verfahren, daß man in dem gleichen Hefeauszug jeweils die genannten Vertreter der verschiedenen Bakteriengruppen gleichzeitig prüfte. Im nachfolgenden sind nun die Versuchsreihen mit den verschiedenen Bakterien auseinandergenommen, indem wir es für richtiger hielten, das Verhalten der einzelnen Bakterienarten im Zusammenhang darzustellen. — Die zu verschiedener Zeit hergestellten Hefeauszüge zeigten an und für sich kleinere Unterschiede in der Zusammensetzung, was uns veranlaßt, dieselbe jeweils anzugeben. Aus der Bezeichnung der Auszüge läßt sich ersehen, daß für die Feststellung der Umsetzung der gleichen Substanz durch die verschiedenen Bakterien stets der nämliche Hefeauszug zur Verwendung gelangte.

Für die Heranzucht der Bakterien erwies sich besonders geeignet der Saft der gut ausgereiften Schweizer Wasserbirne, in welchem die Kulturen bei einer Temperatur von 23° gewöhnlich schon nach 14 Tagen den Höhepunkt ihrer Entwicklung erreichten und als Material zur Aussaat in die Versuchsflüssigkeiten sehr geeignet waren. Der Hefeauszug wurde jeweils aus frisch bezogener, auf Grund unserer mikroskopischen Prüfung als verhältnismäßig sehr rein erkannter, Preßhefe in der Weise hergestellt, daß man 1 kg Hefe in Leitungswasser aufschlammte und aufkochte, dann mit Leitungswasser auf 10 l verdünnte, 10 g Äpfelsäure zusetzte und nach gründlichem Aufrühren im Kochschen Dampftopf bei 100° sterilisierte. Die Sterilisation wurde in Unterbrechungen von einigen Tagen mehrmals wiederholt. Der Zusatz von 1‰ Äpfelsäure hatte den Zweck, eine vollkommene Sterilisation bei 100° zu sichern. Nach ca. 14-tägigem Absitzenlassen gelangten diese Hefeauszüge jeweils zur Filtration und wurden dann in die Versuchsflaschen verteilt, wo vor dem Zusatz von Bakterien eine nochmalige Sterilisation stattfand. In mehrfacher Beziehung wäre es wünschenswert gewesen, diese Hefeauszüge so zu filtrieren, daß von den von der Preßhefe herrührenden, aber wie Kontrollversuche zeigten, sicher getöteten Bakterien keine in die Versuchsflüssigkeiten gelangt wären. Der Versuch, dies durch das Chamberland-Filter zu erreichen, mißlang aber wegen der schleimigen Beschaffenheit der Flüssigkeit. Bei der Filtration durch ein kleines Seitzsches Asbestfilter erhielt man zwar glänzend klare Flüssigkeiten, allein bei längerem Stehenbleiben fand sich doch ein kleines Depot von toten Bakterien, die zwar die Resultate nicht beeinflußten, jedoch unter Umständen bei photographischen Aufnahmen hinderlich werden konnten. Diesen Hefeauszügen wurden dann meist vor der Verteilung in die Versuchsflaschen die benützten Zuckerarten, Säuren oder Salze zugefügt. Da es sehr darauf

ankommt, hierfür reine Substanzen zu verwenden, wurden sie als chemisch reine Präparate von der Firma C. A. F. Kahlbaum, Berlin, bezogen.

Die Aussaat der Bakterien aus dem Wasserbirnsaft in die Versuchsflaschen fand nicht mit der Platinöse statt, sondern mittels einer kleinen Pipette und je nach dem zur Verfügung stehenden Aussaatmaterial wurden jeweils einige Tropfen bis etwa $\frac{1}{4}$ ccm zugesetzt. Als Versuchsgefäße dienten enghalsige Rollflaschen von 100—400 ccm Inhalt, die nach der Infektion mittels sterilisierter Korkstopfen und Haydickscher Gärverschlüsse verschlossen wurden. In der Regel kamen die Versuchsflaschen, in denen über der Flüssigkeit noch eine Luftschicht von ca. 1—3 cm Höhe lagerte, in einen Brutraum von 23° zu stehen. In den meisten Lösungen, wo Wachstum eintreten konnte, war an der eintretenden Trübung eine ziemlich rasche Entwicklung der Bakterien zu erkennen, die ihren Höhepunkt nach ca. 14 Tagen erreichte und nach ca. 4 Wochen gewöhnlich abgeschlossen war, worauf dann mit der chemischen Untersuchung begonnen werden konnte.

Bei dieser kamen zur Bestimmung die Gesamtsäure, die flüchtige Säure und die Milchsäure; bei der flüchtigen Säure wurde in einigen Fällen nach der Duclauxschen Methode die Art derselben bestimmt; ferner wurde der Gehalt an Mannit, an Alkohol und eventuell an verbleibendem Zucker ermittelt.

Zur Bestimmung der Gesamtsäure verwenden wir $\frac{n}{10}$ Natronlauge und Lakmus- ev. Azolitminpapier; bei der flüchtigen Säure destilliert man aus 50 ccm Flüssigkeit mit Wasserdampf in der Zeit von 50 Minuten 200 ccm über und titriert im Destillat den Säuregehalt mit Phenolphthaläin als Indikator. Die Milchsäure bestimmten wir nach dem Möslingerschen Chlorbaryumverfahren, in zuckerhaltigen Flüssigkeiten nach dem sauren Verfahren (Möslinger 1; p. 1123). Mannit wird nach der Methode von Gayon und Dubourg (1; p. 1) bestimmt. (S. Borgmanns Anleitung zur chemischen Analyse des Weines II. Aufl.) Die Bestimmung des Zuckers geschieht gewichtsanalytisch mit Fühling scher Lösung und Allihnschen Röhren.

Das Verhalten des *Bacterium mannitopœum* gegenüber den 3 Zuckerarten (S. Tabelle 1) läßt unzweifelhaft erkennen, daß man es mit einem typischen Mannitbacterium zu tun hat, das viele Ähnlichkeit mit dem von Gayon und Dubourg (1 u. 2) genau untersuchten Mannitferment zeigt.

In Dextrose-Lösung wurde der Gehalt an Gesamtsäure bedeutend (um 6,36‰ vermehrt und zwar, wie sich sofort erkennen läßt, durch Bildung von flüchtiger Säure und Milchsäure. Auch Gayon und Dubourg (2; p. 546) geben von ihrem Bacterium eine starke Bildung von flüchtiger Säure an und zwar haben sich auf 100 g vergorene Dextrose 5,5—11,9 g flüchtige Säure gebildet. In unserem Versuch entstanden auf 100 g verschwundener Dextrose 13,2 g flüchtige Säure. Aus der Darstellung von Gayon und Dubourg läßt sich übrigens erkennen, daß sie weitere Schwankungen als die angegebenen für ihr Bacterium für möglich halten. Ob wir die reichlich gebildete Milchsäure in Übereinstimmung mit den Befunden von Gayon und Dubourg als ein Gemisch von viel inaktiver mit wenig links drehender Milchsäure betrachten dürfen, möchten wir dahingestellt sein lassen, da nach den Ergebnissen verschiedener Forscher die Art der entstehenden Milchsäure nicht nur wesentlich von der Art des Bacteriums abhängt, sondern auch von der Beschaffenheit des gebotenen Nährmediums. Berechnet man aus der

Gesamtsäure und flüchtigen Säure den Gehalt an nicht flüchtiger Säure, so wird man bemerken, daß dieser genau mit dem Gehalt an Milchsäure übereinstimmt; auf Milchsäure umgerechnet, würde die nicht flüchtige Säure nämlich 5,29 g ergeben, also soviel als wirklich gefunden wurde. Es zeigt dies, daß die Milchsäure in nicht gebundener Form vorhanden sein muß. Der durch das Bacterium aus Dextrose gebildete Alkohol (3,75 g) entspricht ca. 7,5⁰/₁₀₀ Zucker (100 Zucker = ca. 50 Alkohol); es sind also ca. 40 Proz. des vorhandenen Traubenzuckers der alkoholischen Gärung verfallen. Gayon und Dubourg (2; p. 551) haben bei ihren Versuchen gefunden, daß mindestens 50 Proz. Dextrose in Alkohol und Kohlensäure zerlegt wurden. Wir haben den Kohlensäureverlust bei dieser Gärung nicht genauer bestimmt, doch konnten wir in allen der in Tabelle 1 aufgeführten Fälle eine kräftige Kohlensäureentwicklung beobachten. Mannit fanden wir trotz sorgfältiger Untersuchung keinen, was mit den Angaben von Gayon und Dubourg über ihr Bacterium übereinstimmt. Die vollständige Abwesenheit von Zucker in der Versuchsflüssigkeit beweist, daß das Bacterium die Dextrose vollständig zu zersetzen vermochte. Als Hauptprodukte des Gärungsvorganges des Bacterium mannitopæum f in Dextrose erscheinen demnach Essigsäure, Milchsäure, Alkohol und Kohlensäure. Daß die flüchtige Säure in diesem Falle wirklich Essigsäure war, wurde nach der von Duclaux geschaffenen Methode festgestellt. Die bei der fraktionierten Destillation gefundenen Zahlen stimmten mit den von Duclaux (1; p. 386) angegebenen Ziffern nahezu vollständig überein.

Tabelle 1.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nichtflüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Alkohol g im l	Mannit g im l	Zucker als Invertzucker g im l
Hefeauszug I + Dextrose, steril .	0,74	0,28	0,43	0,36	0,0 ¹⁾	—	19,48
„ I „ + Bact. mannit. f . .	7,10	2,85	3,96	5,28	3,75	0,0	0,0
Hefeauszug II + Lävulose, steril .	0,77	0,34	0,40	0,90	0,0	—	23,96
„ II „ + Bact. mannit. f . .	6,63	3,61	2,66	3,92	0,0	6,69	0,92
Hefeauszug III + Galaktose, steril	0,47	0,27	0,17	0,68	0,0	—	ca. 20
„ III „ + Bact. mannit. f (1) . .	7,10	3,30	3,47	4,26	3,50	0,0	—
„ III „ + Bact. mannit. f (2) . .	6,83	3,06	3,46	4,64	—	—	—
Hefeauszug I ohne Zuckerzus., steril	0,74	0,28	0,43	0,36	0,0	—	—
„ I o. Zuckerzus. + Bact. mannit f	0,87	0,42	—	0,66	0,0	—	—

Auch in der Nährlösung mit Lävulose verursachte das Bacterium mannitopæum f eine beträchtliche Erhöhung des Gesamt-

¹⁾ In dieser und den folgenden Tabellen bedeutet das Zeichen 0,0 die nachgewiesene vollständige Abwesenheit eines Stoffes, während das Zeichen — angibt, daß eine diesbezügliche Untersuchung nicht stattgefunden hat.

säuregehaltes und zwar um etwa 6‰; die Erhöhung ist wiederum zurückzuführen auf die Erzeugung von Essigsäure und Milchsäure. Doch ist hier im Vergleich zur Dextroselösung die Bildung flüchtiger Säure stärker und die der Milchsäure etwas geringer. Immerhin bleiben beide innerhalb der von Gayon und Dubourg für ihr Mannitferment angegebenen Grenzen. Für die Essigsäure fanden wir 13,6 Proz. der vergorenen Lävulose (Gayon und Dubourg 13—16 Proz.) und für die Milchsäure 12,6 Proz. (Gayon und Dubourg 9,8—15 Proz.). Äthylalkohol wurde auch von unserem Bacterium aus Lävulose nicht gebildet, dagegen 6,69 g Mannit. Da Mannit in seiner Zusammensetzung von Lävulose sich dadurch unterscheidet, daß er 2 Atome Wasserstoff mehr enthält, so verursachen also diese Bakterien eine Synthese, herbeigeführt durch einen Reduktionsvorgang. Jedoch unterscheidet sich unser Bacterium in dieser Fähigkeit von demjenigen von Gayon und Dubourg, indem es z. B. in diesem Fall aus 100 g Lävulose nur 27,9 g Mannit zu bilden vermochte, während Gayon und Dubourg für ihren Organismus 62—72 Proz. Mannit angeben. Es kann nicht wohl angenommen werden, daß dieser Unterschied durch die Art der Versuchsanstellung herbeigeführt wurde, denn auch Gayon und Dubourg arbeiteten mit Hefeauszug und geben ausdrücklich an, daß bei einem Gehalt an Lävulose, wie wir ihn wählten, die Mannitbildung in die von ihnen angegebene Grenze falle. Auch ist eine nachträgliche Zersetzung von Mannit bei den Versuchen mit Reinkulturen ausgeschlossen; Bacterium mannitopœum f. vermag, wie wir später zeigen werden, Mannit nicht anzugreifen. Von den weiteren Umsetzungsprodukten der Lävulose verdient eines noch besonders hervorgehoben zu werden, das sich durch einen sehr unangenehmen fußschweißartigen Geruch bemerkbar macht. Im Geschmack zeigt die Kulturflüssigkeit bei der Kostprobe einen deutlichen Mäuselgeschmack oder Geruch nach Acetamid. Wie bei Dextrose, so machte sich auch in der Lävuloselösung bei der Tätigkeit von Bacterium mannitopœum f. Kohlensäureentwicklung bemerkbar.

Die Umsetzung der Galaktose zeigte ziemliche Übereinstimmung mit derjenigen der Dextrose. Die Erhöhung des Gesamtsäuregehaltes war annähernd die gleiche. Doch wurde etwas mehr flüchtige Säure und dafür etwas weniger Milchsäure gebildet. Der Milchsäuregehalt (34,8 Proz. der Galaktose) fällt noch in die von Gayon und Dubourg angegebenen Grenzen (22—38,8 Proz.); dagegen wurde von unserem Bacterium mehr flüchtige Säure gebildet, 15 Proz. (nach Gayon und Dubourg 5,6 bis 10,3 Proz.). Auch die Alkoholbildung war bei unserem Bacterium geringer, nämlich 17 Proz. der verschwundenen Galaktose (nach Gayon und Dubourg 25,6—30,8 Proz.). Mannit konnte in der vergorenen Flüssigkeit nicht konstatiert werden. Auch bei der Zersetzung der Galaktose fand Kohlensäureentwicklung statt. Der zweite in der Tabelle 1 angeführte Versuch mit Galaktose ergab ein ziemlich übereinstimmendes Resultat. Um den Anteil festzustellen, den etwa Bestandteile des Hefeauszuges selbst an dem zustandegekommenen Resultate haben könnten, wurde der Hefeauszug I für sich allein zu einem Versuch benützt. Das Bacterium vermochte sich etwas zu entwickeln, wenn auch nicht in dem Maße, wie bei Anwesenheit von Zucker. In Übereinstimmung damit erwies sich die Produktion von flüchtiger Säure und Milchsäure als eine so geringe, daß sie die oben besprochenen Resultate nicht zu beeinflussen vermag.

Vorstehende Versuchsergebnisse zusammengefaßt ergeben,

daß das *Bacterium mannitopœum* f alle 3 Hexosen zum Wachstum und zu Umsetzungen in ausgiebigem Maße benutzt, aus allen 3 verhältnismäßig viel flüchtige Säure, viel Milchsäure und Kohlensäure bildet. Aus Dextrose und Galaktose entsteht daneben Äthylalkohol, aus Lävulose Mannit. Bei der Umsetzung von Dextrose und Lävulose tritt der Mäuselgeschmack auf.

Von dem Mannitbacterium Gayon und Dubourgs, das sich in ähnlicher Weise verhält, unterscheidet sich das unsrige in der Hauptsache dadurch, daß es bei der gleichen Menge verbrauchter Dextrose weniger Alkohol, bei der Lävulose weniger Mannit und bei der Galaktose mehr Essigsäure bildet.

2. *Bacterium mannitopœum* f in Lösungen von Saccharose, Laktose, Maltose und Raffinose.

Bei der Versuchsanstellung wurde im wesentlichen in gleicher Weise verfahren, wie es bei den Hexosen beschrieben ist. Dagegen konnten hier die Zuckerarten nicht vor der endgültigen Sterilisation zugefügt werden, weil sonst in dem etwas angesäuerten Hefeauszug eine teilweise Inversion hätte eintreten können. Es wurde daher der zubereitete Hefeauszug für sich in die Flaschen gefüllt, in diesen sterilisiert und erst nach dem Abkühlen die für sich sterilisierte konzentrierte Zuckerlösung unter sorgfältiger Vermeidung einer Infektion mittels Pipette zugesetzt. Der Zusatz war in der Weise bemessen, daß die gesamte Versuchsfüssigkeit hernach im Liter etwa 20 g der betreffenden Zuckerart, bei Raffinose nur 10 g, enthielt. Ca. 5 Wochen nach Beginn des Versuches wurden die Flüssigkeiten untersucht und es ergab sich folgendes Resultat. Versuchstemperatur = 23°.

Tabelle 2.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Alkohol g im l	Zucker als Invertz. g im l
Hefeauszug IV + Saccharose, steril . . .	0,47	0,34	0,10	0,56	—	17,16
„ IV + „ + Bact. man- nit. f . . .	6,20	2,94	2,97	4,14	1,30	0,0
Hefeauszug IV + Laktose, steril . . .	0,53	0,34	0,16	0,56	—	—
„ IV + „ + Bact. man- nit. f . . .	1,27	0,71	0,49	1,00	0,0	—
Hefeauszug IV + Maltose, steril . . .	0,53	0,34	0,16	0,56	—	—
„ IV + „ + Bact. man- nit. f . . .	5,29	1,58	3,56	4,36	2,78	—
Hefeauszug V + Raffinose, steril . . .	0,37	0,27	0,07	0,54	—	—
„ V + „ + Bact. man- nit. f . . .	2,61	1,94	0,48	1,44	—	—
Hefeauszug IV, ohne Zucker, steril . . .	0,53	0,34	0,16	0,56	—	0,0
„ IV, „ „ mit Bact. mannit. f . . .	0,63	0,37	0,22	0,56	0,0	0,0
Hefeauszug V, ohne Zucker, steril . . .	0,46	0,27	0,16	0,54	—	—
„ V, „ „ mit Bact. mannit. f . . .	0,75	0,34	0,38	0,56	—	—

In der Lösung mit Saccharose erzeugte das Bacterium wiederum viel flüchtige Säure und Milchsäure und erhöhte so den Gesamtsäuregehalt beträchtlich, ganz ähnlich, wie dies bei den Hexosen der Fall war. Von besonderem Interesse erscheint uns hier, daß sowohl Alkohol als Mannit gebildet wurde; letzteren haben wir zwar nicht quantitativ nachgewiesen, sondern nur durch die Beobachtung der charakteristischen Mannitkristalle im eingedunsteten Extrakt. Man könnte sich nun vorstellen, es sei ein Teil des Rohrzuckers durch die allmählich sich anhäufende Säure invertiert und die entstandene Lävulose unter Bildung von Mannit, die Dextrose unter Bildung von Alkohol umgesetzt worden. Dem widersprechen aber verschiedene unserer Befunde. Zunächst wird durch einen Säuregehalt, wie er vorhanden war, in der angegebenen Zeit lange nicht eine so große Zuckermenge ($17,16\%$) invertiert; sodann war es trotz sorgfältiger Untersuchung nicht möglich, in der Flüssigkeit auch nur Spuren von Invertzucker nachzuweisen, was doch der Fall sein müßte, wenn die Inversion durch die in der Flüssigkeit enthaltene Säure stattfinden würde.

Um dieser Frage möglichst auf den Grund zu gehen, wurde noch ein besonderer Versuch durchgeführt. Der betreffende Hefeauszug besaß infolge der zugesetzten Äpfelsäure einen anfänglichen Säuregehalt von $1,07\%$ Äpfelsäure und einen Gehalt von $25,32\%$ Saccharose, als Invertzucker berechnet. Auch hier wurde die Saccharose für sich sterilisiert und dann dem sterilen Hefeauszug zugefügt. Eine anfangs vorgenommene Bestimmung ergab vollständige Abwesenheit von Invertzucker. Das in diese Lösung eingebrachte *Bacterium mannitopæum* f entwickelte sich bei der Temperatur von 23° rasch; in wenigen Tagen trat eine starke Trübung ein. Am 8. Versuchstage wurde der Inhalt einer Flasche untersucht; der Gehalt an Gesamtsäure betrug $3,48\%$ als Äpfelsäure berechnet, während keine Spur von Invertzucker sich vorfand. Wiederum nach 8 Tagen betrug der Gesamtsäuregehalt $6,10\%$ (als Äpfelsäure), derjenige an flüchtiger Säure (als Essigsäure) = $2,19\%$, es fand sich wieder kein Invertzucker. Es war aber doch noch Rohrzucker vorhanden, denn nach der Inversion mit Salzsäure bestimmte man einen Invertzuckergehalt von $12,54\%$. Aus diesem Versuche scheint uns hervorzugehen, daß *Bacterium mannitopæum* kein Enzym ausscheidet, das den Rohrzucker invertiert, denn, wenn die Inversion außerhalb der Bakterien stattfinden würde, so müßte man doch in irgend einem Stadium des Vorganges Invertzucker, wenn auch vielleicht nur in geringen Mengen, nachweisen können. Da nun durch den Säuregehalt jedenfalls nur eine geringe Menge Zucker invertiert wird und eine Inversion durch ein ausgeschiedenes Enzym nicht nachzuweisen war, anderseits aber doch Alkohol und Mannit nebeneinander gebildet wurden, so muß man wohl annehmen, daß die Spaltung der Saccharose im Innern der Bakterien durch ein Endoenzym stattfindet und die beiden Komponenten sofort weiter umgesetzt werden. Die Milchsäurebakterien vermögen im allgemeinen den Rohrzucker zu verarbeiten, allein nur wenige sind imstande, ihn vorher zu invertieren; von *Bacterium lactis acidii* Leichmann hat W. Henneberg (1; p. 13) nachgewiesen, daß ein den Rohrzucker spaltendes Enzym, eine Invertase ausgeschieden wird; anderseits haben Buchner und Meisner den Nachweis geliefert, daß bei *Bacillus Delbrückii*, Leichmann die Spaltung des Rohrzuckers durch ein Endoenzym stattfindet. Unser *Bacterium mannitopæum* f würde also in dieser physiologischen Eigenschaft mit dem letztgenannten Bacterium übereinstimmen,

während das Mannitferment von Gayon und Dubourg nach den Untersuchungen dieser Forscher den Rohrzucker nicht zu invertieren und daher ohne invertierende Einwirkung von Säuren keinen Mannit zu bilden vermag. Der Mäuselgeschmack, der bei dem durch das *Bacterium mannitopœum f* vergorenen Rohrzucker haltigen Hefeauszug deutlich hervortrat, weist des weiteren darauf hin, daß die Saccharose vor der Verarbeitung invertiert wird, denn auch bei der Dextrose und Lävulose konnten wir diese eigenartige Geruchs- und Geschmackserscheinung bemerken.

Die Laktose wird, wie die Ziffern in der Tabelle 2 erkennen lassen, vom *Bacterium mannitopœum f* nur wenig angegriffen. Da dieses die beiden Komponenten der Laktose, nämlich die Galaktose und Glukose, sehr energisch umzusetzen vermag, muß aus dem mitgeteilten Versuchsergebnis wohl geschlossen werden, daß es nicht imstande ist, die Laktose zu spalten, also keine Laktase bildet. Es unterscheidet sich also darin prinzipiell von den eigentlichen Milchkakterien, die den Milchzucker leicht zersetzen, sogar leichter als die anderen Disaccharide; von *Bacillus casei* v. Freudenreich ist sogar nachgewiesen, daß er den Milchzucker besser zu vergären vermag als die Hexosen. Diesem Verhalten entsprechend, war denn auch unser *Bacterium* nicht imstande, bei Kultur in sterilisierter Milch bei 37° während ca. 5 Wochen diese zum Gerinnen zu bringen. Das *Bacterium mannitopœum f* zeigt in dieser Beziehung eine große Übereinstimmung mit dem Mannitferment von Gayon und Dubourg, das ebenfalls unter den Disacchariden die Laktose am wenigsten leicht umzusetzen vermag. Immerhin besitzt das letztere *Bacterium* diese Fähigkeit in höherem Grade als das unsrige. Man könnte diese Verschiedenheit schon aus einem Vergleich der Versuchsergebnisse dieser Forscher mit den unserigen entnehmen, doch ließe sich dem entgegenhalten, es sei vielleicht die verschiedenartige Beschaffenheit des Nährmediums, d. h. der beiden Hefeauszüge, hieran schuld.

Um diesen Zweifel zu beseitigen, führten wir einen besonderen Versuch aus, bei welchem wir in einem Hefeauszug mit Milchzucker (ca. 2½ Proz.) die beiden Bakterien¹⁾ unter ganz gleichen Verhältnissen (bei 23°) kultivierten. Nach 25 Tagen stellte sich das folgende Ergebnis heraus.

Tabelle 3.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug VI, steril	0,74	0,36	0,34	0,61
„ + Laktose + Bact. mannit. f	0,94	0,59	0,29	0,67
„ VI + „ + Mannitferment Gayon et Dub.	2,38	0,74	1,57	1,66

Der Unterschied im Verhalten gegenüber der Laktose zeigt aufs neue, daß unser *Bacterium mannitopœum f* mit dem Mannitferment von Gayon und Dubourg nicht identisch sein kann.

¹⁾ Das Mannitferment von Gayon et Dubourg verdanken wir der Güte von Herrn Prof. Gayon in Bordeaux.

Die Maltose wird vom *Bacterium mannitopœum f* energisch (unter Gasentwicklung) zersetzt, also in ähnlicher Weise wie durch die Milchsäurebakterien der Brenneimaische, der Milch und des Bieres (Henneberg 1; p. 13). Vergleicht man die Ergebnisse unseres in Tab. 2 mitgeteilten Versuches mit Maltose mit den Mengen der Umsetzungsprodukte der Saccharose (gleiche Tabelle) so fällt auf, daß aus Maltose verhältnismäßig wenig flüchtige Säure gebildet wurde. Gayon und Dubourg teilen mit, daß ihr Mannitferment aus 100 Teilen Maltose 6—21 Teile flüchtige Säure bilde; für unser Mannitbacterium würde sich die Zunahme an flüchtiger Säure um 1,24 g in der 2 Proz. Maltose enthaltenden Flüssigkeit auf 6,2 Proz. der Maltose berechnen, also noch der unteren Grenze der Gayon-Dubourgschen Zahlen sich nähern. Auch im Vergleich zu den Hexosen ist aus der zersetzten Maltose auffallend wenig flüchtige Säure entstanden. Die Produktion von Äthylalkohol ist etwa doppelt so groß als bei der Saccharose.

Auch das Trisaccharid, die Raffinose, kann vom *Bacterium mannitopœum f* leicht zersetzt werden. Will man in Tabelle 2 die mit dieser Zuckerart erhaltenen Resultate mit denjenigen der anderen Zuckerarten vergleichen, so muß berücksichtigt werden, daß hier nur 1 Proz. dieser Zuckerart zur Verwendung kam, also nur halb so viel wie bei den übrigen. Als Hauptergebnis tritt die im Verhältnis zur Essigsäurebildung geringe Produktion von Milchsäure hervor. Weder bei einer der Hexosen noch bei den Disacchariden war auch nur annähernd ein ähnliches Verhältnis zu beobachten. Gayon und Dubourg haben unter den Zersetzungsprodukten aus Raffinose bei ihrem Bacterium keinen Mannit gefunden und schließen daraus, daß dasselbe die Raffinose nicht in ihre 3 Komponenten Lävulose, Dextrose und Galaktose zu spalten vermag. Aus unserem Versuchsergebnis läßt sich die gleiche Schlußfolgerung für *Bacterium mannitopœum f* ziehen; denn dieses bildet aus jeder der 3 Hexosen mehr Milchsäure als flüchtige Säure, während die Raffinose, wie schon erwähnt, in anderer Art, wahrscheinlich direkt, angegriffen und dabei viel weniger Milchsäure als flüchtige Säure gebildet wird. Bei genauer Vergleichung der von Gayon und Dubourg erhaltenen Ergebnisse mit den unserigen tritt aber wiederum hervor, daß die beiden verwendeten Organismen voneinander verschieden sind. Gayon und Dubourg haben in zwei Versuchen aus 100 g umgesetzter Raffinose erhalten 12,4 und 12,5 g Essigsäure und 30,9 bzw. 35,15 g Milchsäure, wir dagegen bei *Bacterium mannitopœum f* 16,7 g flüchtige Säure und 9,0 g Milchsäure.

Daß das *Bacterium mannitopœum f*, wenn es in dem mit Äpfelsäure schwach angesäuerten Hefeauszug ohne Zuckerzusatz ausgesät wird, nur ganz unbedeutende Umsetzungen hervorruft, geht aus den letzten Zeilen der Tabelle 2 deutlich hervor. Da das genannte Bacterium die Äpfelsäure verwenden kann, war das Wachstum in diesen Auszügen nicht ganz ausgeschlossen, allein es vermochte doch aus deren Bestandteilen nicht solche Mengen von den von uns bestimmten Produkten zu erzeugen, daß dadurch die Versuchsergebnisse bei den Hefeauszügen mit Zucker hätten getrübt werden können.

Zusammengefaßt ergibt sich aus Vorstehendem folgendes:

In Saccharose, Maltose und Raffinose gedeiht das *Bacterium mannitopœum f* gut und zersetzt die Zuckerarten verhältnismäßig rasch. Gegenüber Saccharose und Maltose verhält es sich

ungefähr gleich und auch übereinstimmend mit den Hexosen, indem es viel Milchsäure und flüchtige Säure bildet und zwar stets mehr von der ersteren. Bei der Raffinose dagegen ist das Verhältnis umgekehrt, d. h. es entsteht mehr flüchtige Säure als Milchsäure. Aus Saccharose und Maltose wird Alkohol unter Kohlensäureentwicklung gebildet; bei der Raffinose wurde die Bestimmung unterlassen. Die Saccharose wird vor der Verwendung durch ein Endoenzym invertiert, die Raffinose dagegen wird sehr wahrscheinlich direkt vergoren ohne Spaltung durch Raffinase. Das mitgeteilte Verhalten unseres Bacteriums gegenüber den zusammengesetzten Zuckerarten Saccharose, Laktose und Raffinose zeigt ebenfalls deutlich, daß es zwar verwandt aber nicht identisch ist mit dem Mannitferment von Gayon und Dubourg.

3. Verhalten gegenüber den Pentosen, l-Arabinose, Xylose und Rhamnose (Isodulcit).

Bei diesen Versuchen wurden die Hefeauszüge schon vor der letzten Sterilisation mit den betreffenden Kohlehydraten versetzt. Die Auszüge VII und VIII säuerte man mit Äpfelsäure an, den Auszug IX mit Rhamnose mit etwas Weinsäure. Von den Pentosen wurden verschiedene Mengen zugesetzt, von der l-Arabinose 12,5 ‰, der Xylose 10 ‰ und der Rhamnose 5 ‰. Wie auch bei den vorhergehenden Versuchen wurden die Gärgefäße in einem dunkeln Brutraum bei 23° aufgestellt. Die Untersuchung, die bei der l-Arabinose und Xylose ca. 5 Wochen, bei der Rhamnose ca. 10 Wochen nach der Impfung vorgenommen wurde, ergab folgendes:

Tabelle 4.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug III + l-Arabinose, steril	0,50	0,27	0,20	0,68
„ III + „ + Bact. mannit. f	9,35	4,96	3,89	5,84
Hefeauszug VII + Xylose, steril	0,73	0,36	0,33	0,61
„ VII + „ + Bact. mannitop. f	6,43	3,60	2,47	3,82
Hefeauszug V + Rhamnose, steril	0,52	0,27	0,22	0,54
„ V + „ + Bact. mannitop. f	0,67	0,28	0,36	0,72
Hefeauszug III (ohne Zucker), steril	0,67	0,27	0,37	0,68
„ III + „ + Bact. mannitop. f	0,73	0,28	0,42	0,54
Hefeauszug V (ohne Zucker), steril	0,52	0,27	0,22	0,54
„ V + „ + Bact. mannitop. f	0,75	0,34	0,38	0,56

Während die Rhamnose von dem Bacterium mannito-pœum f nicht angegriffen wurde, vermochte dieses in den Lösungen mit l-Arabinose und Xylose weitgehende Umsetzungen hervorzurufen, d. h. beträchtliche Mengen von Milchsäure und flüchtiger Säure zu erzeugen. Auffallend ist das Vorwalten der Bildung flüchtiger Säure, denn bei Umrechnung dieser Säuren z. B. auf Äpfelsäure kommt auf die flüchtige Säure ein etwas höherer Betrag als auf die Milchsäure, was abweicht von dem Verhalten z. B. bei Dextrose, Saccharose usw. Dieser hohe Gehalt an flüchtiger Säure

äußert sich namentlich bei dem Hefeauszug mit l-Arabinose auf die Geruchs- und Geschmacksorgane als deutlicher Essigstich. Als wichtigstes Ergebnis dieser Versuchsreihe möchten wir die kräftige Wirkung des *Bacterium* auf die l-Arabinose hervorheben. Wie leicht die Bakterien diese Substanz anzugreifen vermögen, war schon an dem raschen Wachstum zu erkennen. Am 3. Tage nach der Aussaat hatten sie sich derart vermehrt, daß die Flüssigkeit stark getrübt erschien und am Boden ein hohes Depot abgesetzter Bakterien sich befand. Am 14. Tage war der ganze Gärvorgang beendet, was sich aus dem Aufhören der Kohlensäureentwicklung und der Klärung der Flüssigkeit erkennen ließ. Es ist bekannt, daß auch andere Milchsäurebakterien die l-Arabinose leicht angreifen. Doch zeigen sich in dieser Eigenschaft große Verschiedenheiten; so vermochten unter den zahlreichen von Henneberg (1; p. 13) aus Brennereimaische, Milch, Bier, Preßhefe, Melasse, Sauerkohl, sauren Gurken und Sauerteig gezüchteten und geprüften Milchsäurebakterien doch nur wenige die mit Arabinose versetzten Flüssigkeiten schnell zu säuern, wie der *Saccharobacillus pastorianus*, *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* und *Pediococcus acidilactici*, die alle aus Bier stammen.

Die Xylose wurde von unserem *Bacterium* etwas weniger stark angegriffen als die l-Arabinose. Die geringeren Mengen produzierter Essigsäure und Milchsäure können nicht wohl auf den nur wenig niedrigeren Gehalt an Pentose zurückgeführt werden. Im Übrigen stimmte das für *Bacterium mannitepœum* festgestellte Verhältnis der beiden Säuren mit dem von Gayon und Dubourg für ihr *Bacterium* gefundenen überein. Auf 100 g Xylose fanden letztere 41,9 g Essigsäure und 44,7 g Milchsäure, während bei unserem Versuch 36 g Essigsäure und 38 g Milchsäure gebildet wurden. Als ein weiteres Umsetzungsprodukt der Xylose trat beim Mannitferment auch Alkohol auf, worauf wir unser *Bacterium* nicht prüften.

Ein abweichendes Verhalten zeigt das *Bacterium mannito-pœum* gegenüber dem Mannitferment hinsichtlich der l-Arabinose. Gayon und Dubourg geben an, daß von ihrem *Bacterium* die Arabinose nicht angegriffen werde, während unser *Bacterium*, wie des Näheren gezeigt wurde, in dem l-Arabinose haltigen Hefeauszug üppiger gedieh und energischer gärte als bei Anwesenheit irgend eines anderen geprüften Kohlenhydrats. Um jeden Zweifel an dieser grundsätzlichen Verschiedenheit auszuschließen, wurde noch ein besonderer Versuch durchgeführt, bei dem die beiden in gleicher Weise vorgezüchteten Bakterien in gleichbeschaffenem Hefeauszug mit 1 Proz. l-Arabinose ausgesät wurden. Nach ca. 5 Wochen zeigten die Lösungen folgende Gehalte:

Tabelle 5.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug VII + l-Arabinose, steril	0,73	0,36	0,33	0,61
„ VII „ + Bact. mannitop. f . . .	8,04	4,20	3,42	5,16
„ VII „ + Mannitbacterium Gayon et Dubourg	1,13	0,42	0,67	0,60

Zunächst bildet das Resultat dieses Versuches eine Bestätigung der Mitteilung von Gayon und Dubourg, daß ihr Mannitbacterium die l-Arabinose nicht anzugreifen vermöge. Gleichzeitig ist es aber auch ein unzweideutiger neuer Beweis dafür, daß unser Bacterium mannitopœum mit jenem nicht identifiziert werden kann.

Kruse (1; p. 300), der anführt, daß von den langen Milchsäurebazillen nur wenige den Milchzucker zu zerlegen vermögen wie z. B. die aus Milch gezüchteten *Bacillus casei* v. Freudenreich und *Bacillus bulgaricus*, nicht aber die aus malzzuckerhaltigen Nährböden gewonnenen, will dies darauf zurückführen, daß die beiden ersteren in milchzuckerhaltigen Nährböden sich aufzuhalten pflegen. Man könnte nun aus dem verschiedenen Verhalten der beiden oben erwähnten Bakterien eine ähnliche Schlußfolgerung ziehen. Unser Bacterium mannitopœum f. vermag zwar sowohl in Wein als in Obstwein zu leben; allein da die Traubenweine in der Regel einen hohen Säuregehalt aufweisen, so kommt es bei uns doch mehr in milden Obstsäften vor und es will uns scheinen, daß diese Obst-säfte schon infolge der inneren Beschaffenheit der Früchte als auch wegen der Art der Verarbeitung arabinosehaltige Verbindungen enthalten könnten, während dies bei den Traubensäften südlicher Herkunft vielleicht weniger der Fall ist.

Auch in dieser Versuchsweise wurde noch besonders nachgewiesen (letzte Zeilen der Tabelle 4), daß die Hefeauszüge ohne Zusatz von Pentosen durch das zur Verwendung gelangte Bacterium in ihrer Zusammensetzung nicht verändert wurden.

Aus Vorstehendem ergibt sich folgendes Gesamtergebnis:

Von den 3 Pentosen werden durch das Bacterium mannitopœum f. nur l-Arabinose und Xylose, nicht aber Rhamnose angegriffen. Im Verhältnis zur gebildeten Milchsäure wird eine beträchtliche Menge Essigsäure gebildet. Das Bacterium mannitopœum f. unterscheidet sich im Verhalten gegenüber l-Arabinose wesentlich von dem Mannitferment von Gayon und Dubourg, das diese Substanz nicht angreift.

4. Verhalten gegenüber den Glukosiden α Methylglukosid, Amygdalin und Phloridzin.

Die angewendete Methode ist die nämliche, wie bei den übrigen Versuchsreihen. Unter den Glukosiden wurden die ersten beiden zu dem Versuche ausgewählt, weil das Verhalten verschiedener Bakterien zu ihnen schon bekannt ist und dann wurde noch Phloridzin hinzugenommen als ein in den Wurzeln der Obstbäume nachgewiesenes Glukosid. Vom Amygdalin wurde den Lösungen 20⁰/₁₀₀ zugesetzt, vom α Methylglukosid 12,5⁰/₁₀₀ und vom Phloridzin ca. 10⁰/₁₀₀. Da diese Glukoside in der Wärme bei Gegenwart von Säure gespalten werden, so durfte man sie dem angesäuerten Hefeauszug erst nach dem letzten Sterilisieren zusetzen. Zu diesem Behufe stellte man reine Lösungen der Glukoside in Leitungswasser her, sterilisierte diese und fügte dem Hefeauszug unter Beobachtung der nötigen Vorsichtsmaßregeln eine abgemessene Menge zu.

Die Resultate sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Versuchsdauer bei α Methylglukosid und Amygdalin 35 Tage, bei Phloridzin 90 Tage. Eine zweite

Untersuchung wurde vorgenommen bei Amygdalin nach 180 Tagen und bei Phloridzin nach 200 Tagen, Versuchstemperatur 23°.

Tabelle 6.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug III + α Methylglukosid, steril	0,50	0,27	0,20	0,68
„ III „ + Bact. mannit. f	4,02	1,66	2,19	3,46
Hefeauszug VII + Amygdalin, steril	0,73	0,36	0,33	0,61
„ VII „ + Bact. mannit. f (1)	1,00	0,50	0,45	0,54
„ VII „ + Bact. mannit. f (2)	3,68	2,32	1,13	2,62
Hefeauszug V (mit Weins.) + Phloridzin, steril	0,50	0,27	0,20	0,54
„ V „ „ „ + Bact. mannit. f (1)	0,74	0,36	0,34	0,56
„ V „ „ „ + Bact. mannit. f (2)	0,47	—	—	—
Hefeauszug III (ohne Glukosid), steril	0,67	0,27	0,37	0,68
„ III „ „ mit Bact. mannit. f	0,73	0,28	0,42	0,54
Hefeauszug V (mit Weins., ohne Glukosid), steril	0,46	0,27	0,16	0,54
„ V „ „ „ mit Bact. mannit. f	0,67	0,34	0,30	0,56

Von den angewendeten Glukosiden wird durch das *Bacterium mannitopæum f* sowohl das α Methylglukosid als das Amygdalin angegriffen und zwar voraussichtlich unter Abspaltung von Dextrose, die dann von den Bakterien zur Ernährung und Gärung benutzt werden kann. In der Tat stimmt sowohl beim Amygdalin wie aber namentlich beim α Methylglukosid das Verhältnis der gebildeten Essigsäure- und Milchsäuremengen zu dieser Annahme, ebenso die Bildung von Kohlensäure. Von den beiden wird α Methylglukosid entschieden leichter angegriffen, denn das in der Tabelle dargestellte Ergebnis war schon nach 5 Wochen erzielt, während der Amygdalin enthaltende Hefeauszug nach 6 Wochen (1) kaum eine chemisch nachweisbare Veränderung aufwies; daß aber zu dieser Zeit doch schon eine Spaltung von Amygdalin stattgefunden hatte, ließ sich durch einen, wenn auch noch schwachen Geruch nach Bittermandelöl (Benzaldehyd) erkennen. Dies veranlaßte uns, weitere gleichbeschickte Flaschen im Brutraum bei 23° noch längere Zeit zu belassen und erst 34 Wochen nach der Aussaat zu untersuchen (2). Schon beim Öffnen der Flaschen bemerkte man an dem stärker gewordenen Bittermandelölgeruch, daß die Umsetzungen weitergeschritten sein mußten, was dann durch die chemische Untersuchung bestätigt wurde. Da auch hier wohl nur die abgespaltene Dextrose zur Vergärung gelangen konnte, ist das stärkere Vorherrschen der Essigsäure im Vergleich zur Zersetzung des α Methylglukosids auffällig. Man möchte vermuten, daß die lange Dauer, bzw. der langsame Verlauf der Zersetzung eine stärkere Bildung von Essigsäure begünstigt.

Die Spaltung des Amygdalins kann wohl ohne weiteres der Bildung von Emulsin zugeschrieben werden, ob dem bekannten Emulsin oder einem spezifischen Bakterienemulsin, müssen wir dahingestellt sein lassen. Nach der bisherigen Forschung sind nur wenig Bakterien zur Spaltung der Amygdalins

befähigt, so nach Fermi und Montesano (nach Kruse 1; p. 459), die eine Reihe von Bakterien daraufhin systematisch untersuchten, von den bekannten nur einige Rassen des *Bact. coli* und der *Vibrio Metschnikoff*. Auch nach Twort (Kruse 1; p. 459) wird das Amygdalin von Bakterien nur selten zersetzt. Von dem uns besonders interessierenden Mannitbacterium geben Gayon und Dubourg an, daß es Amygdalin nicht angreife. Von Interesse mag noch die Beobachtung sein, daß die Reste in den Versuchsflaschen, nachdem die zur Untersuchung erforderlichen Proben entnommen waren, dauernd steril blieben, während bei anderen Versuchsflüssigkeiten sich dann in der Regel Schimmelpilze an der Oberfläche ansiedelten. Dieses Verhalten ist wohl der neben dem Bittermandelöl entstandenen Blausäure zuzuschreiben.

Der Hefeauszug mit Phloridzin zeigte bei der nach 11 Wochen vorgenommenen Untersuchung noch keine Veränderung (1), ebenso nicht in einer zweiten nach 32 Wochen untersuchten Versuchsflasche (2).

Die beiden zu den oben mitgeteilten Versuchen verwendeten Hefeauszüge erlitten, wenn sie ohne Glukosidzugabe mit dem Bacterium geimpft wurden, keine nachweisbare Veränderung. Die kleinen in den letzten 4 Zeilen von Tabelle 6 bemerkbaren Differenzen bezeugen jedenfalls nur ein geringes Wachstum und beweisen wiederum, daß die Bestandteile des Hefeauszuges nicht störend auf das Ergebnis der Versuche einwirken.

Nur 2 der Glukoside wurden also von dem Bacterium mannitopœum f angegriffen und zwar das α Methylglukosid ziemlich leicht, das Amygdalin nur beilängerer Versuchsdauer. Milchsäure und Essigsäure bilden die Hauptprodukte der Zersetzung; bei Amygdalin macht sich daneben das Bittermandelöl durch seinen Geruch bemerkbar, was die Bildung von Emulsin dartut. Durch diese Spaltung des Amygdalins wird die Verschiedenheit des Bacterium mannitopœum f von dem Mannitferment von Gayon und Dubourg aufs neue dokumentiert.

5. Verhalten gegenüber Mannit, Dextrin und Pepton Witte.

Diese 3 Substanzen wurden aus besonderen Gründen in unsere Versuche hineinbezogen. Mannit, weil die Bakterien dieser und der nächstfolgenden Gruppe Mannit bilden und es wichtig ist zu wissen, ob sie den Mannit schließlich weiter zersetzen können. Das Verhalten gegenüber Dextrin wurde von verschiedenen Forschern zur Charakteristik der Milchsäurebakterien benutzt und aus Pepton sollen gewisse Milchsäurebakterien Milchsäure abspalten können, also nicht nur aus Kohlenhydraten und verwandten Substanzen. Bezüglich der Herstellung der Versuchsflüssigkeiten sei auf die früheren Versuchsreihen hingewiesen. Von Mannit wurden der Lösung 20⁰/₁₀₀, von Dextrin und Pepton je 15⁰/₁₀₀ zugesetzt und zwar sterilisierte man Mannit und Dextrin, in Wasser gelöst, für sich und setzte sie dann erst den schon vorher sterilisierten Hefeauszügen zu. Die 5 Wochen nach der Aussaat vorgenommene Untersuchung ergab folgendes Resultat:

(S. Tabelle 7.)

Die 3 verwendeten Substanzen wurden von den Bakterien nicht angegriffen; die Lösungen waren für deren Gedeihen nicht geeignet. Was den

Mannit betrifft, so stimmt dieses Resultat mit dem von Gayon und Dubourg über ihr Mannitferment mitgeteilten überein. Allerdings ist auch die Versuchsmethode die gleiche. J. Laborde (3; p. 231), der sich mit der gleichen Frage beschäftigte, aber einen anderen Weg einschlug, gibt an, daß das letztgenannte Mannitferment, wie auch 2 von ihm selbst aus umgeschlagenem Wein (vins tournés) gezüchtete, die Fähigkeit besitzen, Mannit zu zersetzen. Er ließ erst die Bakterien in einem mit Lävulose versetzten Hefeauszug sich entwickeln, bestimmte dann den Mannitgehalt, ließ die Flasche noch c. 2 Monate stehen, um die Flüssigkeit nochmals zu untersuchen. Jetzt zeigte z. B. die Flüssigkeit mit dem Mannitbacterium von Gayon und Dubourg, die zuerst 12,26‰ Mannit enthielt, nur noch 9,86‰. Bei den andern beiden sank der Mannitgehalt von 11,92 auf 9,15‰ und von 9,23 auf Spuren von Mannit. Es ist ja nicht ausgeschlossen, daß eine Zersetzung des Mannits eher zu erzielen ist, wenn man nach dem Vorgehen

Tabelle 7.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug IV + Mannit, steril	0,53	0,34	0,16	0,56
„ IV „ + Bact. mannit. f	0,67	0,35	0,28	0,44
Hefeauszug III + Dextrin, steril	0,50	0,27	0,20	0,68
„ III „ + Bact. mannit. f	0,60	0,34	0,23	0,78
Hefeauszug III + Pepton Witte, steril	0,40	0,23	0,15	0,66
„ III „ + Bact. mannit. f	0,54	0,28	0,23	0,66
Hefeauszug IV, ohne Mannit, steril	0,53	0,34	0,16	0,56
„ IV, „ + Bact. mannit. f	0,63	0,37	0,22	0,56
Hefeauszug III, ohne Dextrin, resp. Pepton, steril	0,67	0,27	0,37	0,68
„ III, „ „ „ + Bact. mannit. f	0,73	0,28	0,42	0,54

von Laborde erst eine kräftige Entwicklung der Bakterien ermöglicht; allein trotzdem möchten wir vorderhand bei der Ansicht beharren, daß sowohl unser Bacterium, als dasjenige von Gayon und Dubourg nicht imstande ist, den Mannit anzugreifen. Die Hefeauszüge ohne Zusatz der betreffenden Substanzen zeigten, wie wir schon früher gesehen haben, nach Zusatz des Bacteriums keine Veränderung.

Aus dieser Versuchsreihe geht also hervor, daß Mannit, Dextrin und Pepton Witte durch das Bacterium mannitopœum f nicht angegriffen werden.

6. Verhalten des Bacterium mannitopœum f gegenüber Äpfelsäure und äpfelsauren Salzen.

Die bei diesen Versuchen verwendeten Hefeauszüge wurden in gleicher Weise hergestellt wie schon in früheren Versuchsreihen angegeben ist. Nur bei Auszug VIII verfuhr man etwas anders. Dieser wurde hergestellt ohne anfängliche Ansäuerung und reagierte infolgedessen vollständig neutral, wie nachgewiesen wurde; er mußte auch deshalb wiederholt sterilisiert werden. Nach dem später vorgenommenen Zusatz der Äpfelsäure sterilisierte man

denselben nochmals. Mit Äpfelsäure wurden 2 Versuche angestellt, der zweite mit ungefähr doppelt so viel Äpfelsäure wie beim ersten, um feststellen zu können, bis zu welchem Grade die Äpfelsäure durch unser Bacterium zerlegt werden kann. Das Ergebnis war folgendes:

Tabelle 8.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug VIII mit 2,27 ⁰ / ₁₀₀ Äpfelsäure, steril	2,27	0,43	1,80	0,54
„ VIII „ „ „ „ + Bact. mannit. f . . .	1,67	0,48	1,14	0,76
Hefeauszug VIII mit 4,69 ⁰ / ₁₀₀ Äpfels., steril	4,69	0,42	4,23	0,54
„ VIII „ „ „ „ + Bact. mannit. f (8. IV. 11) . . .	4,49	0,42	4,03	0,66
„ VIII „ „ „ „ + Bact. mannit. f (8. I. 12) . . .	2,37	0,57	1,74	3,26
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Kalium, steril	0,37	0,23	0,12	0,66
„ III „ „ „ „ „ + Bact. mannit. f (26. IV. 11) . . .	0,74	0,22	0,50	0,32
„ III „ „ „ „ „ + Bact. mannit. f (23. V. 12) . . .	0,53	0,19	0,32	—
Hefeauszug IX mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Kalium, steril	1,07	0,39	0,64	0,56
„ IX „ „ „ „ „ + Bact. mannit. f	1,14	0,30	0,81	0,45
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Ammon., steril	1,34	— ¹⁾		0,66
„ III „ „ „ „ „ + Bact. mannit. f	1,54	— ²⁾		0,54
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ saur. äpfels. Calcium, steril . .	3,55	0,23	3,30	0,44
„ III „ „ „ „ „ + Bact. mannit. f	1,34	0,50	0,79	3,06
Hefeauszug V mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Äthyl, steril	1,23	0,27	0,93	0,54
„ V „ „ „ „ „ + Bact. mannit. f (29. VIII.) . . .	1,34	0,66	0,61	1,12
„ V „ „ „ „ „ + Bact. mannit. f (12. I. 12) . . .	1,47	0,62	0,79	1,80

Der erste der beiden mit Äpfelsäure angestellten Versuche läßt zwar einen deutlichen Abbau derselben erkennen, allein doch nur einen geringen; auch die Milchsäureproduktion ist unbedeutend. Der zweite Versuch, bei dem ein an Äpfelsäure reicherer Hefeauszug verwendet wurde, ergab im gleichen Zeitraum von 5 Wochen ebenfalls eine nur unbedeutende fast gar nicht zu bemerkende Veränderung. Bei diesem Versuche wurde dann aber eine Flasche noch 8 Monate länger aufbewahrt und bis dahin vermochte das Bacterium die Äpfelsäure vollständig umzusetzen, wie nachfolgende Rechnung zeigt. Hier müssen wir vorausschicken, daß die bei der Untersuchung der sterilen Hefeauszüge angegebene flüchtige Säure nicht als solche frei vorhanden sein kann, da ja die Hefeauszüge ohne Säurezusatz neutral reagieren. Sie wird wohl in Form von Estern sich finden, die bei der Destillation mit Wasserdampf zersetzt werden. Deshalb ist die titrierte Säure von

¹⁾ Das Destillat von 50 ccm Kulturflüssigkeit reagierte alkalisch und bedurfte zur Neutralisation 4,2 ccm $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure, bei ²⁾ 4,8 $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure.

4,69 ‰ als Äpfelsäure zu betrachten. Aus derselben kann theoretisch durch Säureabbau 3,15 ‰ Milchsäure entstehen. Beim Versuche wurde neugebildet 3,26—0,54 schon anfänglich vorhandene = 2,72 ‰ Milchsäure, also ca. 86 Proz. der berechneten Menge. Natürlich haben die Bakterien auch Äpfelsäure als Nährmaterial verbraucht, und es ist dadurch der konstatierte Verlust genügend erklärt. Rechnet man die gefundene Gesamtsäure weniger die neu gebildete flüchtige Säure = 2,2 ‰ in Milchsäure um, so erhält man 2,95 ‰, was annähernd der neu gebildeten Menge von 2,72 ‰ Milchsäure entspricht. Es ist wohl anzunehmen, daß die neu gebildete Milchsäure hier in freier Form sich vorfindet, wie dies überhaupt bei den Versuchen mit Hefeauszügen in der Regel der Fall ist. Anders verhält es sich aber, wenn Salze organischer Säuren umgesetzt werden, was aus einem der nachfolgenden Versuche deutlich hervorgeht und was auch beim Säureabbau in Weinen, namentlich entsäuerten der Fall ist. Während unser Bacterium beim Abbau von Kohlehydraten neben Milchsäure stets auch beträchtliche Mengen von flüchtiger Säure, Essigsäure, bildet, ist dies, wie aus diesem Versuch hervorgeht, beim Abbau von Äpfelsäure nicht der Fall. Noch möge erwähnt sein, daß Gayon und Dubourg von ihrem Mannitferment angeben, daß es Äpfelsäure nicht angreife.

In dem Hefeauszug mit neutralem äpfelsaurem Kalium fand im Laufe von 5 Wochen sozusagen keine Umsetzung statt. Um zu prüfen, ob eine solche bei längerer Versuchsdauer doch noch eintreten könnte, ließ man eine Versuchsflasche noch ein ganzes Jahr stehen; allein auch dann ließ sich keine Veränderung der Lösung erkennen. Bei einer anderen Gelegenheit stellte man nochmals einen Versuch mit einem anderen 10 ‰ äpfelsaurem Kalium enthaltenden Hefeauszuge an, allein, wie aus der Tabelle zu ersehen ist, wieder mit dem gleichen negativen Erfolg.

Auch das äpfelsaure Ammonium (10 ‰) wurde von dem Bacterium mannitopœum f nicht angegriffen.

Anders war das Verhalten gegenüber dem sauren äpfelsauren Calcium. Schon nach wenigen Tagen zeigte eine schwache Gasentwicklung, daß die Bakterien tätig waren, und die nach 5 Wochen vorgenommene Untersuchung ließ einen ziemlich weitgehenden Abbau des Salzes erkennen. Auch hier bildete das Bacterium nur wenig flüchtige Säure = 0,3 ‰, dagegen viel Milchsäure, die weitaus mehr beträgt, als die bestimmte titrierbare Gesamtsäure ausmacht. Daraus muß geschlossen werden, daß in diesem Falle die neu gebildete Milchsäure gebunden wurde und zwar durch das Calcium, das beim Abbau des Salzes frei wird.

In Hefeauszug mit 10 ‰ äpfelsaurem Äthyl fand nur ein schwaches Wachstum des Bacteriums statt; immerhin hat eine Umsetzung der zugesetzten Verbindung unzweifelhaft stattgefunden, was am besten an der Erhöhung des Milchsäuregehaltes zu erkennen ist. Auch die flüchtige Säure hat etwas zugenommen, zwar nicht erheblich, aber doch etwas mehr als bei der Umsetzung der Äpfelsäure.

Daß die verwendeten Hefeauszüge ohne Zusätze durch das Bacterium mannitopœum f nicht wesentlich verändert werden, haben wir schon mehrmals dargetan, so z. B. für die Auszüge III und V in Tabelle 6 auf Seite 174.

Das Bacterium mannitopœum f vermag nach vorstehend mitgeteilten Versuchsergebnissen sowohl die freie als

auch die im sauren äpfelsauren Calcium und äpfelsauren Äthyl gebundene Äpfelsäure zu zersetzen und zwar unter Bildung von viel Milchsäure und nur wenig flüchtiger Säure; bedeutend weniger als das saure äpfelsaure Calcium wird das äpfelsaure Äthyl angegriffen, gar nicht hingegen das neutrale äpfelsaure Kalium und das äpfelsaure Ammonium. Beim äpfelsauren Calcium wird die entstehende Milchsäure durch das Calcium gebunden. Das Mannitferment greift nach Gayon und Dubourg die Äpfelsäure nicht an.

7. Verhalten des *Bacterium mannitopæum* f gegenüber der Weinsäure und weinsauren Salzen.

Bezüglich der Versuchsanstellung verweisen wir auf die Angaben bei den vorhergehenden Versuchsreihen und wollen hier nur hervorheben, daß in nachfolgender Tabelle, die die Ergebnisse zusammenfaßt, die Gesamtsäure nicht als Äpfelsäure sondern als Weinsäure aufgeführt wurde.

Tabelle 9.

	Gesamtsäure als Weinsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Weinsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug VIII mit 2,32 ⁰ / ₁₀₀ Weinsäure, steril	2,32	0,43	1,78	0,54
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f (27. III. 11)	2,32	0,49	1,71	0,32
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f (8. I. 12) .	2,32	—	—	—
Hefeauszug VIII mit 5,02 ⁰ / ₁₀₀ Weinsäure, steril	5,02	0,43	4,48	0,54
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f (27. III. 11)	4,87	0,43	4,33	0,32
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f (8. I. 12) .	4,95	—	—	—
Hefeauszug V mit 10 ⁰ / ₁₀₀ saur. weins. Kalium, steril . . .	2,56	0,27	2,22	0,54
„ V „ „ „ „ + Bact. mannit. f (27. III. 11) .	2,62	0,64	1,82	0,44
Hefeauszug IX mit 15 ⁰ / ₁₀₀ saur. weins. Kalium, steril . . .	3,60	0,39	3,11	0,56
„ IX „ „ „ „ + Bact. mannit. f	3,09	0,50	2,47	0,56
Hefeauszug V mit 10 ⁰ / ₁₀₀ neutr. weins. Kalium, steril . . .	0,30	0,27	—	0,54
„ V „ „ „ „ + Bact. mannit. f	0,52	0,26	0,20	0,44
Hefeauszug V mit 10 ⁰ / ₁₀₀ neutr. weins. Ammon., steril . .	— ¹⁾	0,19		0,54
„ V „ „ „ „ + Bact. mannit. f	— ²⁾	0,27		0,36

Wie aus vorstehender Tabelle hervorgeht, vermochte das *Bacterium* weder die freie noch die gebundene Weinsäure anzugreifen. Da z. B. bei

¹⁾ Ließ sich nicht genau titrieren, ca. 0,48⁰/₁₀₀.

²⁾ Ließ sich nicht genau titrieren, ca. 0,82⁰/₁₀₀.

den Versuchen mit Äpfelsäure der Hefeauszug sich als ein gutes Substrat erwies, so kann das negative Resultat doch nur der Art der Säure zukommen. Einer allzu sauren Beschaffenheit kann die Schuld auch nicht zugeschoben werden: 2,3 ‰ Weinsäure bedingen doch einen geringen Säuregrad, wenn man berücksichtigt, daß das *Bacterium mannitopœum* f bei 6,56 ‰ Äpfelsäure noch sehr gut gedeiht. Auch die Versuchsdauer war gewiß ausreichend, indem bei den Versuchen mit reiner Weinsäure die zweite Bestimmung 322 Tage nach der Aussaat vorgenommen wurde. Nach den Befunden von Gayon und Dubourg gehört die Weinsäure zu jenen Stoffen, die ihr Mannitbakterium nicht angreift. Laborde (3, p. 230) züchtete aus umgeschlagenen Weinen (vins tournés) 2 Mannitbakterien, die bei seinen mit Wein angestellten Versuchen einen Teil des Weinstein bis zu 1 g pro Liter zersetzten und nach seiner Ansicht daraus Propionsäure bildeten. Auch Duclaux (2; p. 630) führt als eine beim Umschlagen der Weine auftretende Erscheinung das Verschwinden des Weinstein an den Faßwandungen an. Hier handelt es sich offenbar um Bakterien, die von unserem *Bacterium mannitopœum* wesentlich abweichen. Daß es Bakterien gibt, die Weinsäure zersetzen, unterliegt ja nach diesbezüglichen Versuchen von Maassen (1; p. 402) wohl keinem Zweifel. Von den von ihm als Weinsäureverbraucher charakterisierten Bakterien dürfte jedoch nur *Bacillus acidilactici* für unsere Untersuchung einiges Interesse beanspruchen.

Weder freie Weinsäure, noch Weinstein, noch die übrigen verwendeten Weinsäureverbindungen wurden vom *Bacterium mannitopœum* angegriffen. Ebenso verhält sich nach Gayon und Dubourg ihr Mannitferment.

8. Verhalten des *Bacterium mannitopœum* f gegenüber Bernsteinsäure, Zitronensäure und Milchsäure.

Bernsteinsäure und Zitronensäure wurden zu den Versuchen herangezogen, weil sie natürliche Bestandteile des Weines bzw. des Obstweines sind, Milchsäure außer diesem Grunde auch noch deshalb, weil es milchsäurebildende Bakterien gibt, die später die Milchsäure noch weiter umsetzen. In der Tabelle, in der die Resultate zusammengestellt sind, wurde der Gesamtsäuregehalt nicht wie in den meisten bisherigen Tabellen als Äpfelsäure berechnet, sondern als diejenige Säure, die man zusetzte.

(S. Tabelle 10.)

Von den 3 zu dem Versuche benutzten Säuren wurde nur die Zitronensäure durch das *Bacterium* zersetzt, und zwar nur da, wo die Lösung nicht zu sauer war. Einige Milchsäurebakterien werden in der Literatur angeführt, die die Bernsteinsäure zu zersetzen vermögen. Von den von uns geprüften, aus Weinen gezüchteten, war hierzu keines befähigt.

Im Hefeauszug mit 2,45 ‰ Zitronensäure fand bei unseren Versuchen schon während 5 Wochen ein deutlicher Abbau der Säure statt. Der Säuregehalt sank auf etwa die Hälfte. Im weiteren Verlauf trat dann keine wesentliche Veränderung mehr ein. Bei dieser Zersetzung wurde sowohl Essigsäure als Milchsäure erzeugt, von letzterer aber weniger. Daß Bakterien Zitronensäure zersetzen können, ist übrigens schon länger bekannt. So hat Fitz (Nach Kruse (1); p. 445) eine Gärung des zitronen-

sauren Calciums beobachtet, bei der neben Essigsäure auch noch etwas Alkohol und Bernsteinsäure entstand. Besonderes Interesse mögen noch Beobachtungen über die Zersetzung der Zitronensäure von Seifert (3) beanspruchen. In Johannisbeerweinen, die sich ungünstig verändert hatten, eine ziemliche Säureabnahme zeigten und dabei doch essigstichig erschienen,

Tabelle 10.

	Gesamt- säure g im l	Flüch- tige Säure als Essig- säure g im l	Milch- säure g im l
Hefeauszug VIII mit 2,33‰ Bernsteinsäure, steril	2,33	0,43	0,54
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	2,24	0,43	0,54
Hefeauszug VIII mit 4,86‰ Bernsteinsäure, steril	4,86	0,43	0,54
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	4,72	0,49	0,36
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	4,89	—	—
	als Bern- steinsäure		
Hefeauszug VIII mit 2,45‰ Zitronensäure, steril	2,45	0,43	0,54
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	1,26	1,10	1,00
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	1,40	1,04	1,12
Hefeauszug VIII mit 5,25‰ Zitronensäure, steril	5,25	0,43	0,54
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	5,04	0,47	0,44
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	4,83	0,52	0,56
	als Zitro- nensäure:		
Hefeauszug VIII mit 2,88‰ Milchsäure, steril	2,88	0,49	2,92
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	2,79	0,38	2,92
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	2,88	—	—
Hefeauszug VIII mit 5,30‰ Milchsäure, steril	5,30	0,49	5,62
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	5,22	0,39	5,16
„ VIII „ „ „ + Bact. mannit. f	5,85	0,54	5,72
	als Milch- säure:		

fand der genannte Forscher im Trub stäbchenförmige Bakterien von 2 μ Länge und 1 μ Dicke, oft 2—4 zu kurzen Ketten vereinigt. Diese Bakterien konnte er zwar nicht rein kultivieren; allein mit dem Trub vermochte er gesunden Johannisbeerwein ebenfalls krank zu machen, wobei die Gesamtsäure von 9,00 auf 5,1 ‰ sank, die Essigsäure von 0,64 auf 2,6 ‰ stieg und die Milchsäure von 0,73 auf 0,90 ‰ sich vermehrte. Das allein machte es wahrscheinlich, daß es sich hier nicht um einen Äpfelsäureabbau handeln konnte; denn die Bildung von Milchsäure war nur gering. Da die Säure der Johannisbeeren aus einem Gemisch von Äpfelsäure und

Zitronensäure besteht, so konnte beim Johannisbeerwein an einen Abbau der letzteren gedacht werden. Versuche, die Seifert mit dem betreffenden Trub in künstlichen Nährlösungen mit Äpfelsäure oder Zitronensäure anstellte, ergaben dann auch, daß die Zitronensäure eine ähnliche Zersetzung erlitt, wie er sie bei den Johannisbeerweinen festgestellt hatte. Das in dem Johannisbeerweintrub vorkommende Bacterium zeigte in seinen Größenverhältnissen etwelche Übereinstimmung mit unserem Bacterium mannitopœum f und man wird in der Vermutung, es möchte damit identisch sein, noch bestärkt durch die Angaben Seiferts über die Zersetzung der Äpfelsäure unter Bildung von viel Milchsäure und über das Vorkommen der gleichen Bakterien in Traubenweinen. Das Mannitferment von Gayon und Dubourg vermag nach diesen Autoren die Zitronensäure nicht anzugreifen und unterscheidet sich also auch hierin von unserem Bacterium.

Wohl finden sich in der Literatur einige Angaben über Milchsäurebakterien, die die gebildete Milchsäure noch weiter zersetzen. Unser Bacterium mannitopœum f gehört nicht dazu, denn trotz der langen Versuchsdauer von 9 Monaten blieb der Milchsäuregehalt der Nährlösungen konstant. Die in der zweitletzten Zeile der Tabelle angemerkte Veränderung möchten wir den der Bestimmungsmethode anhaftenden Fehlerquellen zuschreiben.

Bernsteinsäure und Milchsäure werden durch das Bacterium mannitopœum f nicht zersetzt, wohl aber Zitronensäure in nicht zu saurer Lösung und zwar unter Bildung von ziemlich viel flüchtiger Säure und einer geringeren Menge Milchsäure.

9. Verhalten des Bacterium mannitopœum f gegenüber verschiedenen Alkohol- und Säuremengen.

Die Versuchsflüssigkeit zur Prüfung der Einwirkung des Alkoholgehaltes wurde in der Weise hergestellt, daß man einem mit etwas Weinsäure angesäuerten Hefeauszug noch ca. 20 ‰ Dextrose zusetzte (nach nachträglich vorgenommener Untersuchung = 19,2 ‰ als Invertzucker bestimmt). Um Verluste von Alkohol während des Sterilisierens zu verhüten, wurde erst zum Schluß den sterilisierten Auszügen absoluter Alkohol (99-proz. von Kahlbaum) mittels sterilisierter Pipette unter Beobachtung der übrigen bakteriologischen Vorsichtsmaßregeln zugefügt. 60 Tage nach der Bakterienaussaat fand die Untersuchung statt, die folgendes Ergebnis lieferte:

(S. Tabelle 11.)

Berücksichtigt man den Milchsäuregehalt, so haben die 3,75 Gewichtsproz. Alkohol noch keinen hemmenden Einfluß auf die Tätigkeit der Bakterien ausgeübt; bei 7,66 Gewichtsproz. entsprechend 9,66 Vol.-Proz. ist ein solcher dann aber deutlich wahrzunehmen. Doch vermochten bei diesem Alkoholgehalt, der in Obstweinen wohl kaum je erreicht und von unseren leichteren Traubenweinen auch nicht oft überschritten wird, die Bakterien noch gut zu wachsen und nicht unbedeutende Umsetzungen zu verursachen. Die Wachstumsgrenze liegt offenbar erst bei einem ziemlich höheren Alkoholgehalt, der allerdings nach den vorliegenden Resultaten nicht genau anzugeben ist. Bei 11,69 Gewichtsproz. = 14,6 Vol.-Proz. war dagegen kein

Bakterienwachstum mehr möglich. Nach Henneberg (1) vermögen die aus Maische und Bier gezüchteten *Bac. Delbrücki* (Leichmann) und *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* Henneberg, sowie die aus Milch erhaltenen *Bacillus lactis acidii* Leichmann und *Bacterium lactis acidii* Leichmann bei 10 Vol.-Proz. Alkohol keine Säuerung mehr zu verursachen, was vielleicht damit zusammenhängt, daß sie in diesen Medien niemals so viel Alkohol vorfinden. Das von Gayon und Dubourg untersuchte Mannitbakterium, das wie unser *Bacterium mannitopœum f* aus Wein stammt, verhält sich unter ähnlichen Ernährungsbedingungen gegenüber dem Alkohol ähnlich wie dieses. Bei 12 Vol.-Proz. vermochte es noch bemerkbare Zersetzungen hervorzurufen.

Tabelle 11.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug X ohne Alkohol, steril	1,00	0,37	0,59	0,54
„ X „ „ + Bact. mannit. f	8,07	3,26	4,48	5,04
„ X + 3,75 Gew. % Alk. + „	7,44	2,06	5,17	5,32
„ X + 7,66 „ + „	4,55	1,10	3,34	3,92
„ X + 11,69 „ + „	1,00	0,54	0,41	0,54
„ X + 15,65 „ + „	0,87	—	—	—

Von den in der Tabelle dargestellten Resultaten verdient eines hier noch besondere Beachtung. Bei 3,75 Gewichts-Proz. hat sich sogar noch etwas mehr Milchsäure gebildet als ohne Alkohol; demgemäß sollte man auch noch einen etwas höheren Essigsäuregehalt erwarten. Das war nun nicht der Fall, er war sogar 1,2 ‰ niedriger. Da kein Grund zu der Annahme vorliegt, daß wirklich weniger Essigsäure gebildet wurde, so muß man wohl annehmen, daß bei Gegenwart von Alkohol ein Teil der Essigsäure in eine Esterverbindung überging. Ähnliches trifft zu bei der Flüssigkeit mit 7,66 Gewichts-Proz. Alkohol. Auf 100 g Milchsäure beträgt der Gehalt an flüchtiger Säure bei 0 Gewichts-Proz. Alkohol 64,5; bei 3,75 Gewichts-Proz. Alkohol 38,7; bei 7,66 Gewichts-Proz. Alkohol 28,0.

In Übereinstimmung mit früheren Versuchen, wo Dextrose durch das *Bacterium mannitopœum f* zersetzt wurde, trat auch hier, sofern eine stärkere Umsetzung stattfand, ein deutlicher Mäuselgeruch zu Tage.

Bei den Versuchen über den Einfluß des Säuregehaltes auf das Wachstum des *Bacterium mannitopœum f* wurden dem mit Äpfelsäure schwach angesäuerten und mit 10 Proz. Dextrose versetzten Hefeauszug in den verschiedenen Flaschen ungleiche Mengen Äpfelsäure zugefügt; die hierauf festgestellten Mengen sind in der Tabelle 12 nebst den gefundenen Resultaten bekannt gegeben.

Schon nach 3 Tagen ließ sich der hemmende Einfluß des höheren Äpfelsäuregehaltes deutlich erkennen, indem die Flüssigkeit mit 3,15 ‰ Äpfel-

säure sich trübte und Gasentwicklung zeigte, während dies bei den übrigen noch nicht der Fall war. Bei 6,56 ‰ Äpfelsäure wurde diese Erscheinung erst nach 14 Tagen beobachtet. Der mit höherem Säuregehalt zunehmende hemmende Einfluß läßt sich übrigens auch aus den Umsetzungsprodukten erkennen. 9,65 ‰ Äpfelsäure vermochten die Entwicklung der Bakterien noch nicht zu verhindern, wohl aber stark zurückzuhalten. Bei 12,46 ‰ Äpfelsäure fand dagegen keine Entwicklung mehr statt. Die Grenze dürfte etwa unter den obwaltenden Verhältnissen bei 11 ‰ liegen. Nur hiernach bemessen, könnte man denken, es sei kein Obstwein gegen dieses Bacterium

Tabelle 12.

				Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure
				g im l	g im l	g im l	g im l
Hefeauszug	XI +	3,15 ‰	Äpfelsäure, steril	3,15	0,35	2,76	0,54
„	XI +	3,15 ‰	„ + Bact. mannit. f	5,69	2,53	2,91	2,12
„	XI +	6,56 ‰	„ steril	6,56	0,35	6,17	0,54
„	XI +	6,56 ‰	„ + Bact. mannit. f	8,97	2,63	6,08	2,59
„	XI +	9,65 ‰	„ steril	9,65	0,35	9,26	0,54
„	XI +	9,65 ‰	„ + Bact. mannit. f	9,71	0,71	8,93	1,76
„	XI +	12,46 ‰	„ steril	12,46	0,35	12,07	0,54
„	XI +	12,46 ‰	„ + Bact. mannit. f	12,26	0,62	11,58	0,48
„	XI +	15,54 ‰	„ steril	15,54	0,35	15,15	0,54
„	XI +	15,54 ‰	„ + Bact. mannit. f	15,07	0,53	14,49	0,66

geschützt, allein es darf der gleichzeitig mitwirkende hemmende Einfluß des vorhandenen Gerbstoffes und Alkohols hier nicht unberücksichtigt bleiben. So kommt es, daß man das Bacterium mannitopœum f nur in säurearmen Weinen und Obstweinen antrifft, und ebenso ist man in der Lage, durch teilweise Entsäuerung von Traubensäften, die man dann der spontanen Gärung überläßt, mit ziemlicher Sicherheit die Entwicklung des Bacterium mannitopœum zu erzielen, während es in den nicht entsäuerten Proben nicht auftritt. Zu den in der Tabelle angeführten Einzelergebnissen möge noch erwähnt werden, daß in den Lösungen nicht nur die Dextrose, sondern auch die Äpfelsäure zum Teil umgesetzt wurde. Es läßt sich dies durch Berechnung feststellen. Bei 3,15 ‰ Äpfelsäure z. B. ergibt die vorhandene Milchsäure bei Umrechnung 1,57 ‰ Äpfelsäure, die flüchtige Säure 2,8 ‰, zusammen 4,37 ‰; subtrahiert man dies von der gefundenen Gesamtsäure 5,69 ‰, so erhält man nur 1,32 ‰ noch vorhandene Äpfelsäure, während doch ursprünglich 3,15 ‰ vorhanden waren. Ähnliches zeigt sich bei den übrigen Flüssigkeiten.

Sowohl Alkohol als Äpfelsäure vermögen nach obigem die Entwicklung und Tätigkeit des Bacterium mannitopœum f zu hemmen. Bei 7,66 Gewichts. Proz. (gleich 9,66 Vol. Proz.) Alkohol fand noch eine ziemlich ausgiebige Umsetzung von Dextrose statt, während bei 11,69 Gewichts. Proz. Alkohol (gleich 14,6 Vol. Proz.) eine Entwicklung der Bakterien nicht mehr zu beobachten war.

Bei 9,65‰ Äpfelsäure wurde die Umsetzung der Dextrose noch nicht vollständig verhindert, während 12,46‰ Äpfelsäure keine Bakterienentwicklung mehr aufkommen ließ.

10. Einfluß der Temperatur auf die Gärtätigkeit des *Bacterium mannitolpœum*.

Schon die Beobachtung, daß bei Weinen und Obstweinen der Milchsäurestich hauptsächlich bei hohen Temperaturen eintritt, weist auf die günstige Einwirkung höherer Wärmegrade auf das Wachstum des diese Krankheit verursachenden *Bacterium mannitolpœum* hin. Diesen Einfluß sollte ein genauer Versuch feststellen. Es wurde dazu Wasserbirnsaft verwendet, in dem erfahrungsgemäß die Bakterien gut gedeihen. Diesen Saft füllte man in 300 ccm Flaschen ab, sterilisierte ihn, verschloß die Flaschen nach dem Einbringen der Bakterien mit Gärverschlüssen und brachte sie, je 3 gleichbehandelte, in die verschiedenen Abteilungen eines großen P a n u m -schen Thermostaten. Es kam bei diesem Versuche nicht die bisher benutzte Rasse f zur Verwendung, sondern das damit nahe verwandte aus Gutedelwein gezüchtete *Bacterium t.* Die Temperaturen im Thermostaten waren nicht ganz konstant, schwankten aber kaum 1°. Der verwendete Obstsaft zeigte nachstehende Zusammensetzung. In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Gehalte an Gesamtsäure und flüchtiger Säure zusammengestellt. Die Milchsäure wurde nur in den nach 79 Tagen entnommenen Versuchsfaschen bestimmt.

Anfängliche Zusammensetzung des Obstsaftes: 2,27‰ Gesamtsäure (Äpfels.); 0,19‰ flüchtige Säure (Essigs.); 0,56‰ Milchsäure.

T a b e l l e 13.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l			Flüchtige Säure als Essigsäure g im l			Milch- säure g im l
	nach 10 Tagen	nach 23 Tagen	nach 79 Tagen	nach 10 Tagen	nach 23 Tagen	nach 79 Tagen	nach 79 Tagen
Bei 6,5°	2,27	2,34	4,22	0,29	0,37	1,87	0,04
„ 9,8°	2,31	2,95	5,56	0,12	1,08	2,44	4,60
„ 14,0°	2,34	4,02	6,60	0,76	1,32	3,05	5,22
„ 18,5°	3,21	4,75	7,91	1,33	1,96	3,72	6,30
„ 22,5°	3,88	5,43	8,71	1,64	2,35	4,17	6,56
„ 26,5°	4,82	5,69	6,43	1,90	2,55	2,95	5,26
„ 34,5°	4,89	4,62	4,69	1,89	2,01	2,14	4,82

Berücksichtigt man nur die Befunde nach 10 Tagen, so findet die lebhafteste Säurebildung bei 26,5° und bei 34,5° statt und es kann wohl, ohne stark fehlzugreifen, das Optimum etwa auf die Mitte, also auf ca. 30° verlegt werden. Anders verhält es sich, sobald wir die späteren Termine in Betracht ziehen. Nach 23 Tagen ist bei 26,5° am meisten Gesamtsäure und flüchtige Säure vorhanden und nach 79 Tagen liegen die höchsten Säuregehalte bei 22,5°. Wir müssen hier übrigens unterscheiden zwischen S ä u r e g e s c h w i n d i g k e i t und erreichtem S ä u r e g r a d. Im Anfang, so lange noch nicht viel Säure vorhanden ist, nimmt der Säuregehalt, wie bereits erwähnt, bei 26,5—34,5° am raschesten zu. Bei diesen Temperaturen ist also die Säurebildung jetzt am größten. Man wird wohl diesen anfänglichen Vor-

gang am zweckmäßigsten als Maßstab für die Säuerungsgeschwindigkeit annehmen. Später wird der Vorgang komplizierter, indem die vorhandenen Säuren, vor allem die Essigsäure, ungünstig auf das Wachstum der Bakterien und ihre Tätigkeit einwirken und zwar in um so höherem Maße, je höher die Temperatur ist. Nur so läßt sich erklären, daß bei 34,5° vom 10. Tage an die Gesamtsäure gar nicht mehr und die flüchtige Säure nur noch wenig zugenommen hat und bei weitem nicht den Grad erreichte, wie bei 22,5°. Ja selbst bei 26° macht sich dieser nachteilige Einfluß schon bemerkbar, wenn auch in geringerem Maße. Hier fand noch eine stetige Zunahme, selbst nach dem 23. Tage statt, allein doch nicht mehr in dem Grade, wie bei 22,5°, ja nicht einmal wie bei 18,5°. Bei diesen niederen Temperaturen haben die Bakterien noch bei einem hohen Säuregehalt weiter zu arbeiten vermocht und schließlich einen höheren Säuregrad erreicht als bei den hohen Temperaturen von 26,5° und 34,5°, bei denen die anfängliche Säuerungsgeschwindigkeit größer war. Voraussichtlich hat die Bildung der Milchsäure ungefähr im gleichen Maße stattgefunden wie die der Essigsäure und es wird nach den gemachten Darlegungen verständlich sein, daß bei 22,5° und 18,5° am 79. Tage mehr Milchsäure vorhanden ist als bei 26,5° oder gar bei 34,5°. Ganz parallel scheinen aber doch die beiden Vorgänge nicht zu verlaufen, indem bei 6,5° auf 1,85 ‰ Essigsäure 4,04 ‰ Milchsäure kommen, bei 18,5°, wo der Essigsäuregehalt 3,72 ‰ also genau das doppelte beträgt, nur 6,3 ‰ Milchsäure, also nicht doppelt so viel wie bei 6,5°. Es können, wie aus dem Versuch hervorgeht, selbst bei niederen Temperaturen diese Bakterien bei lange andauernder Wirkung beträchtliche Mengen von Essigsäure und Milchsäure erzeugen und so einen Obstwein stichig machen. Für ihr Mannitferment geben Gayon und Dubourg 35° als Optimum an, wobei sie wahrscheinlich die anfängliche Säuerungsgeschwindigkeit verstehen, allerdings ohne dies ausdrücklich hervorzuheben.

Bei den meisten anderen Milchsäurebakterien liegt das Optimum der Säuerung (wobei wohl stets die anfängliche Säuerungsgeschwindigkeit gemeint ist) bei höheren Temperaturen, bei manchen zwischen 30 und 35°, bei zahlreichen erst bei 40 oder gar 45°. Bei 24°—33° liegt nach Henneberg (1; p. 47) das Optimum von *Saccharobacillus pastorianus* und bei 20°—24° dasjenige von dessen Varietät *berolinensis*.

Bei unserem *Bacterium mannitopæum* liegt das Optimum der Säuerungsgeschwindigkeit zwischen 26,5° und 34,5°, dasjenige des Säuregrades bei 18,5°—22,5°.

11. Einfluß des Sauerstoffzutrittes auf das *Bacterium mannitopæum*.

Um die Bakterien bei Sauerstoffabschluß kultivieren zu können, wurden die betreffenden Versuchsflaschen (mit Wattestopfen und darüber gebundener Papierhülle verschlossen) unter tubulierte Glasglocken gestellt. Diese Glasglocken, in weiteren Glasschalen stehend, wurden zunächst durch in den Rand der letztern eingegossenes Paraffin abgeschlossen. Auf das Paraffin brachte man hernach Quecksilber und dann Paraffinöl. Die obere Öffnung der Glasglocken war durch einen doppelt durchbohrten gut passenden Gummistopfen verschlossen, der zudem noch paraffiniert wurde. Von den 2 durch diesen Stopfen gehenden Glasröhren reichte die eine bis auf den Boden, während

die andere unter dem Stopfen endete. Bei Beginn des Versuches wurde nun durch die letztere Wasserstoff eingeführt und längere Zeit ein Strom durch die Glasglocke durchgeleitet, sodaß schließlich das austretende Gas sich nur noch als Wasserstoff erwies. Der durchgeleitete Wasserstoff wurde vor dem Eintritt in die Glasglocken gereinigt, indem man ihn der Reihe nach durch Flaschen mit Lösungen von Bleinitrat, Silbernitrat und Pyrogallol + 1 Proz. Kalilauge leitete. Während des Durchleitens wurden dann die Zu- und Ableitungsröhren zugeschmolzen. Im Innern der Glasglocken stand neben den Versuchsgefäßen auch noch eine Flasche mit Pyrogallolösung + 1 Proz. Kalilauge, zur Absorption etwa noch vorhandener Spuren von Sauerstoff. Die Glasglocken kamen in einen Brutraum von 19° zu stehen und daneben dann die ebenfalls durch Wattestopfen und Papierhaube verschlossenen Versuchsflaschen, bei denen eine Einwirkung von Sauerstoff ermöglicht war.

Als Versuchsflüssigkeit diente ein mit Weinsäure etwas angesäuerter Hefeauszug, dem ca. 2 Proz. Dextrose zugesetzt wurde. 39 Tage nach Beginn des Versuches wurden die Versuchsflüssigkeiten untersucht und es ergab sich nachfolgendes Resultat:

Tabelle 14.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug X mit 19,2°/∞ Dextrose, steril	1,03	0,37	0,62	0,54
„ X „ 19,2°/∞ „ + Bact. mannit. f mit Luft. . .	8,71	3,88	4,44	5,06
„ X „ 19,2°/∞ „ + Bact. mannit. f ohne Luft .	8,37	3,35	4,69	5,40

Vorstehendes Versuchsergebnis läßt deutlich erkennen, daß *Bacterium mannitopœum f* sowohl bei Sauerstoffzutritt als bei Sauerstoffabschluß zu wachsen und zu gären vermag. Wenn ein kleiner Unterschied zu bemerken ist, so ist dies zugunsten des Sauerstoffzutrittes. Auch ein nach gleicher Methode durchgeführter früherer Versuch Müller-Thurgaus (6; p. 453) mit dem gleichen Bacterium ergab ein übereinstimmendes Resultat. Demgemäß sind also die Bakterien weder streng aërob noch streng anaërob; da sie aber doch ohne Luft, wenn auch etwas weniger gut, zu gedeihen vermögen, wird man sie als fakultative Anaërobier zu bezeichnen haben. Laborde (1; p. 3) rechnet das Mannitferment von Gayon und Dubourg, sowie die von ihm selbst gezüchteten Mannitbakterien zu den Anaëroben, worunter er aber nicht nur strikte Anaërobier versteht. Mazé und Pacottet (1; p. 548) bezeichnen ihre aus zähen, umgeschlagenen und bitteren Weinen gezüchteten Mannitbakterien direkt als anaërob und fügen bei, daß dieselben in der Entwicklung durch den Sauerstoff gehindert werden. Wir können uns kaum dieser Annahme anschließen; man vermißt auch eine genaue Darstellung des Nachweises dieser Eigenschaft.

Das *Bacterium mannitopœum* vermag also nach den gewonnenen Ergebnissen bei Abwesenheit von Sauerstoff fast ebenso gut zu wachsen und zu wirken wie bei Gegen-

wart von solchem, gehört also zu den fakultativen Anaëroben.

12. *Bacterium mannito-pœum* in unvergorenen Obst- und Traubensäften.

Schon bevor wir das Verhalten des *Bacterium mannito-pœum* gegenüber den Kohlenhydraten, organischen Säuren usw. prüften, haben wir untersucht, welche Veränderungen es in unvergorenen Obst- und Traubensäften verursacht. Dabei stellte es sich heraus, daß das *Bacterium* nicht überall gleich gut gedeiht und daß namentlich hoher Säure- und Gerbstoffgehalt nachteilig auf seine Entwicklung einwirken. Im Nachfolgenden finden sich Resultate mitgeteilt, die zeigen, wie sich *Bacterium mannito-pœum* in 6 verschiedenen Obstsaften verhielt. Die Hauptaufgabe dieser Versuche bestand jedoch darin, hierbei verschiedene Rassen dieses *Bacteriums*, die wir im Verlauf der Untersuchung herangezüchtet hatten, miteinander zu vergleichen. In 3 der Obstsaften gediehen die Bakterien bei durchschnittlich 15° (im Wasserbirnsaft während der ersten 7 Wochen bei 23°) verhältnismäßig gut, während in den 3 übrigen das Wachstum meist nur ein geringes war oder ganz ausblieb. Die Ergebnisse, die in den ersteren erzielt wurden, sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

Bei den Versuchen mit Theilersbirn- und Reinholzbirnsaft wurden im Jahre 1907 die Versuchsflaschen mit den mehrmals sterilisierten Säften durch Hayducksche Gärverschlüsse verschlossen. Bei dem im Jahre 1910 vorgenommenen Versuche mit Wasserbirnsaft, den man ebenfalls einer mehrmaligen Sterilisation unterzogen hatte, bestand der Verschuß nur aus Watte und Papierhaube.

Tabelle 15.

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Theilersbirnsaft 1906, steril	131,04	3,45	0,33	3,09	—	190,9
„ + Bact. mannit. f	91,85	9,98	4,41	5,13	—	175,1
„ + Bact. mannit. k	125,0	3,88	1,56	2,17	—	185,3
„ + Bact. mannit. p	115,01	5,36	2,79	2,29	—	181,4
„ + Bact. mannit. q	98,27	11,62	5,46	5,61	—	176,1
Reinholzbirnsaft 1903, steril	132,38	3,55	0,19	3,34	—	181,7
„ + Bact. mannit. f	85,96	10,85	5,32	5,00	—	168,6
„ + Bact. mannit. k	107,56	7,33	3,55	3,43	—	171,9
„ + Bact. mannit. p	111,5	6,16	2,90	2,97	—	172,8
„ + Bact. mannit. q	94,09	11,82	5,34	5,95	—	167,0
Wasserbirnsaft, steril	89,97	2,21	0,18	2,01	0,78	123,1
„ + Bact. mannit. f	81,4	3,95	1,36	2,45	2,47	—
„ + Bact. mannit. k	89,4	1,81	0,38	1,39	1,80	—
„ + Bact. mannit. p	86,7	2,27	0,86	1,32	1,68	—
„ + Bact. mannit. t	84,7	3,01	0,76	2,17	2,70	—

In allen 3 Säften haben sich die Rassen des *Bacterium mannito-pœum* unter sich verschieden verhalten. Von allen hat q im Theilers-

birnsaft und Reinholzbirnsaft wohl am kräftigsten gewirkt. In beiden Fällen wurde von ihm am meisten flüchtige Säure und Milchsäure gebildet, welch letztere zwar hier nicht bestimmt wurde, aber aus der Zunahme an nicht flüchtiger Säure einigermaßen geschätzt werden kann. Am nächsten, was die Gärungsenergie betrifft, steht q die Rasse f, die ebenfalls sehr kräftig wirkte. Zwischen diesen beiden besteht aber ein wesentlicher Unterschied, indem f den Zucker merklich stärker angegriffen hat als q. Beim Theilersbirnsaft betrug die Mehrabnahme an Zucker durch f gegenüber q 6,42 ‰. Da nun im Extrakt nur ein Unterschied von 1 ‰ besteht, so muß f einen Extraktstoff in höherem Grade gebildet haben als q und das kann unseres Erachtens nur Mannit sein. Das gleiche Verhalten zeigen die beiden Bakterienrassen im Reinholzbirnsaft, wo f 8,13 ‰ Zucker mehr verbrauchte und wo trotzdem der Extraktgehalt um 1,6 ‰ höher war. Auch hier muß eine ziemliche Menge Mannit mehr gebildet worden sein als durch q. In der Säurebildung war q der Rasse f etwas überlegen, in der Mannitbildung muß f ausgiebiger gewirkt haben. Die beiden Rassen k und p erwiesen sich entschieden als weniger kräftig wachsend und wirkend, was sowohl aus dem Verbrauch von Zucker als auch aus der Produktion von flüchtiger und nicht flüchtiger Säure hervorgeht.

Das interessante Bacterium q ging uns bei der weiteren Kultur verloren und findet sich daher bei dem Versuche mit Wasserbirnsaft nicht mehr aufgeführt. An seine Stelle ist ein aus Gutedelwein gezüchtetes Bacterium mannitopæum t eingereiht worden, das ebenfalls kräftig säuert, aber doch eher schwächer als f ist. Die angegebenen Zahlen, sowie weitere Eigenschaften, z. B. auch das schon früher erwähnte morphologische Verhalten lassen diese Rasse t als eine von den übrigen verschiedene erkennen. Auch in diesem Saft erwiesen sich die beiden Rassen k und p schwächer als die übrigen. Es zeigt sich dies nicht nur in der Produktion von flüchtiger und nicht flüchtiger Säure, sondern auch in der Bildung von Milchsäure, die hier direkt nachgewiesen wurde. In Theilersbirnsaft, sowie in Reinholzbirnsaft, wo die Bakterien durchwegs gut gediehen, machte sich eine deutliche Kohlensäureentwicklung bemerkbar, die bei den stärker wirkenden Rassen f und q zu einem förmlichen Moussieren der Säfte führte, so daß man hier den Eindruck einer Hefegärung hatte.

Auch das Aussehen der im Trub dieser Obstsäfte abgesetzten Bakterien sowie dasjenige des Depots selbst bestärkte uns in der Überzeugung, daß wir es bei den genannten Bakterien mit verschiedenen Rassen zu tun haben. So fanden sich im Trub des Reinholzbirnsaftes mit Bacterium f neben vereinzelter Stäbchen und Fäden eine große Zahl kleiner, noch miteinander verbundener Zoogloeen, wie sie in der Abhandlung Müller-Thurgau (6) geschildert und auf Tafel III, Fig. 67 und 75 abgebildet sind (vgl. auch Taf. III, Fig. 30 unserer Abhandlung). Bei Bacterium q waren gar keine solchen vorhanden, während bei k und p, wo weniger Trub sich gebildet hatte, größere und isolierte Zoogloeen vorkamen (Abbildung 72 in vorerwähnter Abhandlung). Auch im Wasserbirnsaft, wo keine Zoogloeen gebildet wurden, zeigte der Trub verschiedene Beschaffenheit. In den Flaschen à 300 ccm mit f hatte sich ein mächtiges weißes Bakteriendepot von 1 cm Höhe gebildet, während diese Schicht bei t nur $\frac{1}{2}$ cm maß und bei k und p noch weit weniger Depot vorkam. Der Trub von t bestand aus scharf begrenzten Flocken und ebenso der bei k, doch waren bei letzterem die Flocken klein, bei t dagegen groß. Bei f ließen sich zwar auch Flocken erkennen, doch waren dieselben nicht

scharf voneinander abgegrenzt. Auch bei p waren die Flocken undeutlich, das ganze Depot mehr gleichartig schleimig.

Nachdem wir dargetan haben, daß die genannten Bakterien auch in physiologischer Hinsicht als verschiedene Rassen des *Bacterium mannitopœum* anzusehen sind, möge noch kurz auf das Gemeinschaftliche in ihrer Wirkung auf die genannten Obstsäfte hingewiesen werden. In fast sämtlichen in Tabelle 15 angeführten Fällen hat eine mehr oder weniger starke Zunahme der Gesamtsäure stattgefunden; ganz bedeutend ist diese bei den Bakterien f und q in Theilersbirn- und Reinholzbirnsaft, also da, wo auch die stärkste Umsetzung von Zucker eintrat. Diese Säurezunahme ist einmal der überall beobachteten Neubildung von flüchtigen Säuren zuzuschreiben, sodann muß aber auch noch nicht flüchtige Säure entstanden sein, und zwar wird es sich hierbei, wie wir aus den schon mitgeteilten Versuchen schließen können, in der Hauptsache um Milchsäure handeln. Bei dem Wasserbirnsaft wurde diese Milchsäurebildung direkt nachgewiesen; in diesem letzteren Falle fanden die Umsetzungen im ganzen allerdings nur wenig ausgiebig statt, aus einem Grunde, auf den wir später eintreten werden. Im Theilers- und Reinholzbirnsaft war die Säurebildung weitaus kräftiger und wenn wir die nicht flüchtige Säure in Milchsäure umrechnen, so erhalten wir z. B. beim Theilersbirnsaft mit *Bacterium f* ca. 7 ‰. Eine ausgeführte Bestimmung ergab 10 ‰, also eine noch größere Menge. Auch in den übrigen Fällen, wo viel nicht flüchtige Säure gebildet wurde, darf auf einen entsprechend hohen Gehalt an Milchsäure geschlossen werden. In der Hauptsache dürften die neugebildete flüchtige Säure und Milchsäure vom zersetzten Zucker herrühren.

Daß aber auch diese Bakterien hier die ursprünglich vorhandene Äpfelsäure anzugreifen vermögen, geht aus dem Versuch mit Wasserbirnsaft hervor, wo z. B. bei k die nicht flüchtige Säure nur noch 1,4 ‰ und bei p nur noch 1,3 ‰ beträgt, trotzdem eine ziemliche Menge Milchsäure neugebildet wurde. Es hat also neben der Milchsäurebildung aus Zucker ein Abbau der Äpfelsäure stattgefunden, wobei nach den früheren Versuchen (siehe Tabelle 8, p. 177) ebenfalls Milchsäure entsteht. Auch bei den stärker wirkenden Bakterien wird dieser Säureabbau eingetreten sein. Allein hier, wo eine intensivere Neubildung von Säure aus Zucker stattgefunden hat, ist der Abbau nicht mehr nachzuweisen.

Unter den in der Tabelle 15 dargestellten Resultaten verdient eines noch besondere Berücksichtigung. Da wo die Bakterien energisch wirkten, fand eine beträchtliche Abnahme des Zuckergehaltes statt, z. B. beim Theilersbirnsaft mit *Bacterium f* um ca. 40 g; es sollte dementsprechend auch der Extraktgehalt eine solche Verminderung erlitten haben. Das ist aber nicht der Fall, denn der Extrakt ist nur um 15 g leichter. Daraus ist zu schließen, daß eine beträchtliche Menge einer neuen nicht flüchtigen Substanz gebildet wurde. Nicht flüchtige Säure ist nur etwa 3 g mehr als früher vorhanden, wir dürfen daher wohl annehmen, daß die übrigen ca. 20 g Mannit sind. Wir sind zu dieser Annahme berechtigt, weil diese Bakterien ja Mannit bilden, falls sie Lävulose vorfinden, was im vorliegenden Falle zutraf. Nun enthalten aber diese Obstsäfte nicht nur Lävulose, sondern in gleicher Menge auch Dextrose, und da diese letztere Zuckerart durch unsere Mannitbakterien unter Bildung von Alkohol zerlegt wird, sollte man in den durch die Bakterien vergorenen Säften auch Alkohol erwarten; es konnte jedoch solcher nach der üblichen Destillationsmethode nicht festgestellt werden, woraus wir zu schlie-

Ben berechtigt sind, daß entweder keine oder nur sehr wenig Dextrose umgesetzt wurde und diese Bakterien bei Gegenwart beider Zuckerarten die Lävulose vorziehen. Ein solches Verhalten gibt auch Laborde (1; p. 5) von seinen Mannitbakterien an.

In gleicher Weise und zu gleicher Zeit wie mit dem Theilersbirn- und Reinholzbirnsaft wurden auch Versuche mit etwas säurereicheren Marxenbirn-, Schellerbirn- und Fischbächler-Säften angestellt. Für die ersten 2, in denen die 4 Bakterien gediehen, sind die Ergebnisse in Tabelle 16 vollständig zusammengestellt, während beim Fischbächlersaft nur das Resultat von Bacterium q angeführt ist, da nur letzteres wuchs.

Tabelle 16.

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Marxenbirnsaft 1903, steril	109,18	4,08	0,07	4,00	146,7
„ + Bact. mannit. f	101,47	5,49	0,92	4,48	143,4
„ + Bact. mannit. k	106,46	2,01	0,89	1,03	143,7
„ + Bact. mannit. p	—	2,24	0,84	1,32	143,4
„ + Bact. mannit. q	82,9	8,97	3,50	5,12	138,2
Schellerbirnsaft 1904, steril	116,92	4,42	0,06	4,35	171,1
„ + Bact. mannit. f	109,3	4,42	0,69	3,66	170,0
„ + Bact. mannit. k	112,27	2,41	0,36	2,01	166,5
„ + Bact. mannit. p	113,28	2,01	0,32	1,66	167,9
„ + Bact. mannit. q	99,68	6,53	1,90	4,44	164,4
Fischbächlersaft 1906, steril	110,03	7,97	0,18	7,77	157,8
„ + Bact. mannit. q	97,88	8,92	2,12	6,59	150,6

Im Marxenbirn- und Schellerbirnsaft hat sich das Bacterium q wiederum als das kräftigste gezeigt, sowohl was die Menge des verbrauchten Zuckers als auch die neu gebildete flüchtige und nicht flüchtige Säure betrifft. Etwas weniger energisch wirkte Bacterium f und am schwächsten erwiesen sich wiederum k und p. Auch aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß sowohl Zucker als Säure abgebaut wurden. Die verschwundenen Zuckermengen sind aus der ersten Kolonne direkt zu ersehen. Daß Säure abgebaut wurde, läßt sich in jenen Fällen deutlich erkennen, wo die Zersetzungs Vorgänge nicht so energisch stattgefunden haben, also bei p und k. Im Marxenbirnsaft mit Bacterium k z. B. ist der Gehalt an nicht flüchtiger Säure (als Äpfelsäure) von 4,0 auf 1,03 ‰ gesunken. Bei diesem Säureabbau wird nun aber, wie aus früherem hervorgeht, nur ganz wenig flüchtige Säure gebildet. Wenn trotzdem, namentlich beim Marxenbirnsaft, noch ziemlich viel flüchtige Säure entstanden ist, so muß diese als Umsetzungsprodukt des verschwundenen Zuckers angesehen werden. In ähnlicher Weise wie beim vorigen Versuch (Tabelle 15) läßt sich auch hier aus der ungleichen Abnahme des Zuckers und Extraktgehaltes feststellen, daß Mannit entstanden ist.

Im Fischbächlersaft, der nahezu 8 ‰ Gesamtsäure enthielt, wuchs von den 4 Bakterien nur q, ein neuer Beweis, daß dieses das kräftigste ist. Es wurde aber doch auch in seiner Tätigkeit durch den hohen Säuregehalt etwas gehemmt, wie aus dem Zuckerverbrauch in den verschiede-

nen Säften hervorgeht. Er betrug nämlich hier ca. 12 g, die Extraktabnahme jedoch nur 7 g. Es hat also wieder eine Mannitbildung von ca. 5 g stattgefunden. Bei diesem letzteren Vorgang entsteht erfahrungsgemäß flüchtige Säure und in der Tat hat diese um nahezu 2 ‰ zugenommen. Es wird aber auch Milchsäure gebildet und so müssen wir annehmen, daß die nicht flüchtige Säure (6,59 ‰) zum Teil aus Milchsäure und zum Teil aus Äpfelsäure besteht. Es hat also eine beträchtliche Abnahme der ursprünglich vorhandenen Äpfelsäure (7,7 ‰) stattgefunden.

Interessante Erscheinungen zeigten sich bei der Untersuchung der Bakterien in den besprochenen Obstsäften. Neben den frei lebenden Bakterien fanden sich beim Bacterium f im Marxenbirnsaft eine große Zahl von Bakterienblasen (Über Bakterienblasen, Bakteriocysten vgl. Müller-Thurgau (6), zum Teil sehr große bis $\frac{1}{2}$ cm Durchmesser, in denen die Bakterien in Form von dicht aneinander liegenden Fäden eingeschlossen waren. Von diesen Blasen aus erstreckten sich schlauchartige Ausläufer (wie sie z. B. in der soeben erwähnten Abhandlung Tafel I, Fig. 17 und 18 abgebildet sind). Ähnliche Blasen fanden sich auch in dem Marxenbirnsaft mit Bacterium p. In dem Saft mit k waren die Bakterienblasen kleiner als in den vorigen Fällen und besaßen keine Ausläufer. Wiederum anders zeigte sich in dieser Beziehung das Bacterium q, indem sich hier neben den kleinen Blasen zahlreiche Bakterienkugeln aus dicht verflochtenen Fäden vorfanden, gewissermaßen ein Blasenstadium, bei dem es nicht zur Hautbildung kam.

Auch im Schellerbirnsaft haben sich die 4 Bakterienrassen in dieser Beziehung verschieden verhalten. Während die eine (Bacterium f) Kugeln mit Strängen an den Wänden und am Boden der Flaschen bildete, fanden sich bei k Kugeln ohne Ausläufer und bei q keine Kugeln oder Blasen, dagegen viele unregelmäßig gestaltete Zoogloeen.

Es schien nun von großem Interesse, diese Versuche auch in Traubensäften durchzuführen. Allein wie wir schon früher öfters beobachten konnten, erwiesen sich diese infolge ihres hohen Säuregehaltes für das Bakterienwachstum ungünstig. Um nur einen Fall anzuführen, wuchs in einem Traubensaft (Räuschling) von 1903 mit 12,4 ‰ Weinsäure keine der 4 in Vorstehendem hauptsächlich berührten Rassen von Bacterium mannitopœum. Um doch zum Ziel zu gelangen, wurden bei weiteren Versuchen entsäuerte Traubensäfte verwendet. Die in Tabelle 17 zusammengestellten Ergebnisse betreffen einen Versuch, bei dem ein Traubensaft von Spätburgunder (Clävner) verwendet wurde. Diesen Saft entsäuerte man mit reinem kohlensaurem Kalk so stark, daß entweder nur $\frac{1}{8}$ oder $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Gesamtsäure übrig blieb. Nach Filtration und Sterilisation wurde das Bacterium f ausgesät; die Gärflaschen zu 400 ccm waren mit Gärverschlüssen verschlossen und standen während 22 Wochen bei ca. 16°.

(S. Tabelle 17.)

Sowohl in dem stärker als in dem weniger stark entsäuerten Traubensaft vermochte das Bacterium mannitopœum f ganz gewaltige Zersetzungen hervorzurufen. Mehr als die Hälfte des ursprünglichen Zuckergehaltes ist umgesetzt worden; im schwach entsäuerten 56 Proz., im stark entsäuerten 53 Proz. der ursprünglichen Zuckermenge. Hierbei wurde nun viel flüchtige und nicht flüchtige Säure erzeugt. Ein kleinerer Anteil dieser Säurebildung ist aber wohl auch der Umsetzung der ursprünglich vorhandenen Äpfelsäure zuzuschreiben, die infolge der Entsäuerung wohl größtenteils in Form von saurem äpfelsaurem Calcium sich vorfand. Der außerordentlich

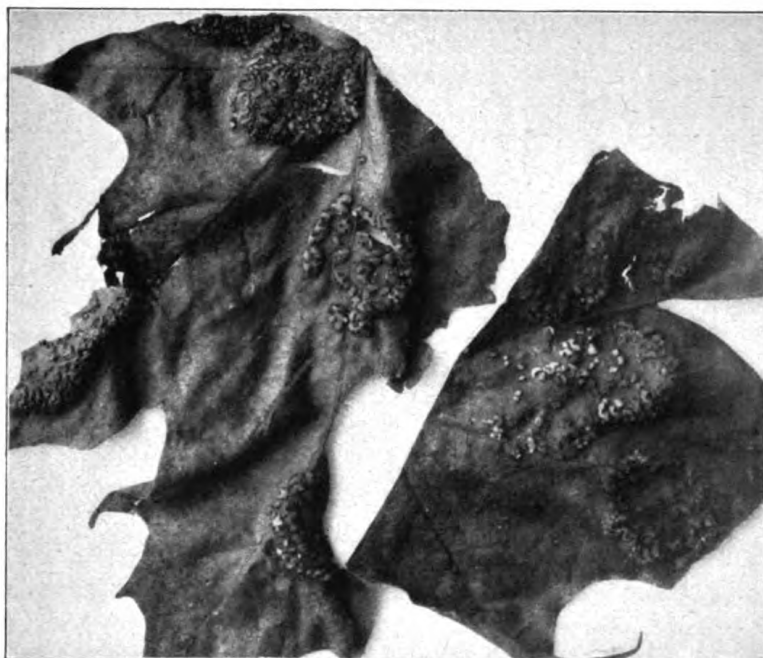


Fig. 5.

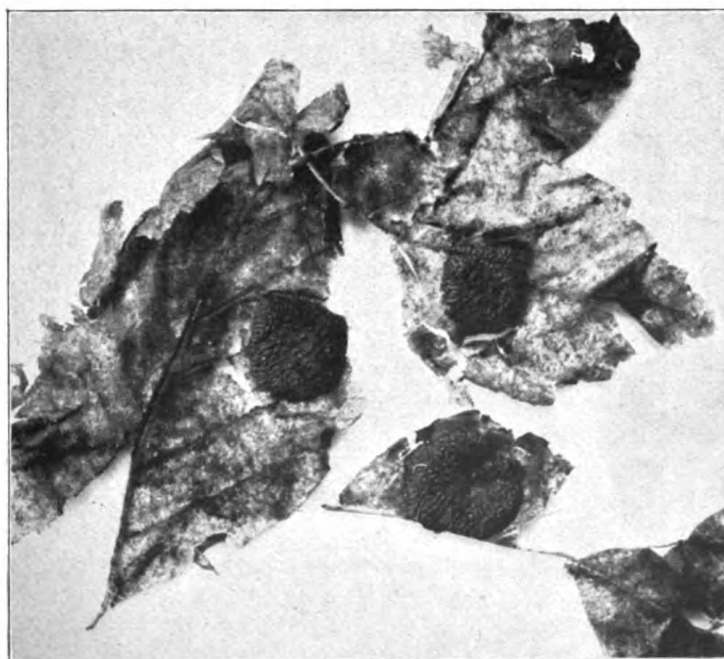


Fig. 6.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Vorschein. Die 5 bei den Versuchen verwendeten Bakterien f, k, p, q und t zeigen in ihrem physiologischen und morphologischen Verhalten solche Unterschiede, daß es gerechtfertigt erscheint, sie als besondere Rassen aufzuführen.

13. Gegenseitige Beeinflussung von *Bacterium mannitopœum* und Hefe.

Da in der Technik der Weinbereitung die Bakterien mit Hefe vergesellschaftet sind, so schien es von Interesse, zu prüfen, inwieweit die Tätigkeit der Bakterien durch die Hefe beeinflusst wird und ob auch eine gegenseitige Beeinflussung stattfindet. Bei einem früheren Versuche zeigte sich, daß bei gleichzeitiger Aussaat die Bakterien nicht gut zur Geltung gelangten. Es wurde hier deshalb so verfahren, daß in die betreffenden Obstsaft nach der Sterilisation zuerst die Bakterien ausgesät wurden und erst nachdem sich dieselben einigermaßen entwickelt hatten (nach ca. 14 Tagen bei 15°), die Hefe. Bei einem ersten Versuch kam ein mit reinem Calciumkarbonat teilweise entsäuerter Schellerbirnsaft zur Verwendung, der 128,76 g Zucker (als Invertzucker) und 2,27 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure) pro Liter enthielt. Als Hefe verwendete man eine reingezüchtete pastoriane Obstweihefe. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 18:

Tabelle 18.

	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Schellerbirnsaft 1906, entsäuert, steril . .	—	2,27	0,12	2,14	—	185,8
„ + Bact. mannit. k . . .	—	0,23	0,26	—	—	182,3
„ + Bact. mannit. k + Hefe	60,68	2,21	1,14	0,96	5,26	46,3
„ + Bact. mannit. p . . .	—	3,35	1,04	2,21	—	184,6
„ + Bact. mannit. p + Hefe	62,10	3,28	0,76	2,44	1,90	45,9
„ + Bact. mannit. t . . .	—	2,27	0,15	2,11	—	185,3
„ + Bact. mannit. t + Hefe	63,58	3,21	0,55	2,61	4,40	44,5

Trotz der Entsäuerung vermochten die Bakterien in diesem Obstwein nicht besonders gut zu gedeihen, was schon aus der geringen Menge gebildeter flüchtiger Säure hervorgeht. Besser sagte dieser Saft den Hefen zu, die hier gut wuchsen und gärten und durch die wenig entwickelten Bakterien nur unbedeutend gehindert wurden. Trotzdem war ein verschiedenes Verhalten der 3 verwendeten Bakterien unverkennbar, was auch aus der Betrachtung der abgesetzten Bakterien hervorging. t zeigte nur ein geringes Wachstum und trat ausschließlich in Form von dicken Fäden auf, während p und k sichtlich kräftiger gewachsen waren und zwar da, wo sie mit Hefen zusammen waren, in noch etwas erhöhtem Maße. Bei diesen letzteren beiden Bakterien fanden sich neben den dicken langen Fäden sehr viele z. T. mit bloßem Auge sichtbare Zoogloeengruppen und vereinzelte kleinere Blasen. In diesen waren die Bakterien merklich zarter als die freilebenden nicht zu Zoogloeen vereinigten oder in Blasen eingeschlossenen, eine Erscheinung, die

wir bei der Zoogloeen- und Blasenbildung öfters beobachten konnten. t hat kaum eine Wirkung ausgeübt, während bei k ein Säureabbau deutlich hervortritt, besonders da, wo es allein wirkte; aber auch bei Gegenwart von Hefe ist der Säureabbau unverkennbar und die noch vorhandene Säure ist als Milchsäure zu betrachten. Dieses hier kräftig gewachsene Bacterium hat nicht nur die Äpfelsäure, und zwar die freie wie die gebundene, vollständig abgebaut, sondern auch noch Zucker zersetzt, was aus den großen Mengen Milchsäure und Essigsäure zu schließen ist. Wenn trotz dieser Milchsäuremenge der Gehalt an nicht flüchtiger Säure gering ist, so beweist dies, daß der weitaus größte Teil der Milchsäure an Calcium gebunden wurde, während aus dem niedrigen Gehalt an Essigsäure geschlossen werden kann, daß wohl der größere Teil der Milchsäure beim Abbau von Äpfelsäure entstand.

Zu einem zweiten ähnlichen Versuch wurde ein Reinholzbirnsaft mit 125,08 g Invertzucker im Liter verwendet, der säureärmer war und daher nicht entsäuert werden mußte.

Tabelle 19.

	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Reinholzbirnsaft 1907, steril	—	2,68	0,34	2,31	—	169,5
„ + Bact. mannit. f	—	7,33	3,93	3,01	4,94	159,5
„ + Bact. mannit. f + Hefe	29,3	4,52	1,08	3,33	2,16	100,2
„ + Bact. mannit. k	—	4,49	1,50	2,84	3,46	164,0
„ + Bact. mannit. k + Hefe	31,3	3,35	0,95	2,31	2,56	94,9
„ + Bact. mannit. p	—	2,74	0,68	1,99	1,12	162,2
„ + Bact. mannit. p + Hefe	23,4	3,08	0,87	2,12	1,56	116,9
„ + Bact. mannit. t	—	7,17	3,13	3,73	4,36	162,0
„ + Bact. mannit. t + Hefe	38,0	3,55	0,70	2,78	2,92	79,2

Hier entwickelten sich die Bakterien wesentlich besser, besonders f und t, bei denen es zur Bildung ansehnlicher Mengen von Essigsäure und Milchsäure kam. Am nächsten steht ihnen k; wesentlich schwächer wirkte p. Bei allen Bakterien übten die von ihnen erzeugten Gärprodukte einen hemmenden Einfluß auf die Hefegärung aus. Nach dem Zuckergehalte zu schließen, müßten diese Versuchsflüssigkeiten einen Alkoholgehalt von mindestens 60 g pro Liter erreicht haben; demnach ist nur die Hälfte des Zuckers wirklich vergoren, obgleich der Versuch nach Zusatz der Hefe noch ein halbes Jahr dauerte. Man wird bei dieser Gärungshemmung in erster Linie an einen Einfluß der Essigsäure und Milchsäure denken; auffällig ist dann allerdings das Verhalten bei Bacterium p, wo die Hemmung sich am stärksten bemerkbar machte, obgleich der Gehalt an diesen Säuren der niedrigste ist. Möglicherweise hat irgend ein anderes Gärprodukt, das nicht zur Bestimmung kam, hier mitgewirkt. Umgekehrt haben die Hefen, obgleich sie erst später zugesetzt wurden, die Tätigkeit der Bakterien ebenfalls gehemmt, so daß bei Gegenwart der Hefe erheblich weniger Essigsäure und Milchsäure gebildet wurde, als bei alleinigem Vorkommen von Bakterien. Eine Ausnahme bildet p, vielleicht gerade deswegen, weil dieses Bacterium so energisch auf die Hefe einwirkte.

Im Gegensatz zu ihrem Verhalten im Schellerbirnsaft bildeten die Bakterien in diesem natürlich anders zusammengesetzten Reinholzbirnsaft keine Zoogloen und auch keine Blasen, eine Verschiedenheit, die man bei der Kultur der Bakterien in verschiedenen Säften öfters wahrnehmen kann. Aber nicht nur das Zustandekommen dieser eigenartigen Gebilde hängt von der Beschaffenheit des Obst- und Traubensaftes ab, sondern auch das Aussehen der freilebenden Bakterien, die Bildung von langen ungeteilten oder in kürzere Glieder geteilten Fäden oder der Zerfall in Kurzstäbchen. Von einzelnen Forschern, namentlich französischen, wird oft diesem verschiedenen Verhalten hinsichtlich der Entwicklung oder Segmentation in einseitiger Weise ein großes Gewicht bei der Unterscheidung der verschiedenen Bakterienarten beigelegt, während wir der Ansicht sind, daß die Beschaffenheit des Mediums in dieser Richtung eine bedeutende Rolle spielt. Die Bakterien f und t haben in dem Reinholzbirnsaft sich ähnlich verhalten. Während in anderen Medien unsere 4 Rassen von *Bacterium mannitolopæum* als lange verschlungene Fäden ohne oder mit wenig sichtbaren Gliederungen sich finden, zeigten sich die Fäden in Reinholzbirnsaft durchwegs in Kurzstäbchen eingeteilt.

Mazé und Pacottet (1) haben mit den aus bitteren und umgeschlagenen Weinen gezüchteten mannitbildenden Bakterien ähnliche Versuche in Traubensaft ausgeführt und gefunden, daß diese Bakterien, gleichzeitig mit der Hefe ausgesät, sich so gut entwickeln als da, wo sie allein waren. Die Hefe hinderte die Bakterien also nicht in der Entwicklung. Dagegen wirkten diese hemmend auf die Hefe ein durch ihre Säurebildung. Selbstverständlich übten diese Bakterien ihren hemmenden Einfluß auch dann aus, wenn sie, wie es bei unseren Versuchen der Fall war, schon vor der Hefe ausgesät wurden.

Hefen und Bakterien können sich bei gleichzeitiger Anwesenheit gegenseitig beeinflussen, doch ist dies nicht immer in gleicher Weise der Fall; im einen Falle (Schellerbirnsaft) vermochte das *Bacterium* das Hefewachstum nicht zu hemmen; im anderen Falle, (Reinholzbirnsaft) wo die Bakterien sich schon anfangs kräftiger entwickelten, trat eine solche Hemmung ein. Andererseits vermag die Hefe das Bakterienwachstum unter Umständen zu fördern (Schellerbirnsaft) in andern Fällen aber auch zu hemmen (Reinholzbirnsaft).

14. *Bacterium mannitolopæum* in Trauben- und Obstweinen.

Eine Hauptaufgabe unserer Untersuchung erblickten wir darin, die Mitwirkung der von uns gezüchteten Bakterien beim Zustandekommen von Weinkrankheiten festzustellen. Da solche Bakterienkrankheiten oft erst nach abgeschlossener Gärung auftreten, so wurden Versuche mit 4 Rassen von *Bacterium mannitolopæum* in einem vergorenen Rotwein, einem Weißwein und mit f auch bei einem Obstwein durchgeführt. Nun hatten uns frühere Erfahrungen genugsam gezeigt, daß diese Bakterien, in vollständig vergorene säurereiche Getränke gebracht, nur selten gedeihen und es wurde aus diesem Grunde ein Versuch mit einem 1910er Clävner Wein, sofort nach seiner Klärung, ausgeführt. Den in Versuchs-

flaschen abgefüllten Wein sterilisierte man bei 70°. Um den Bakterien das Gedeihen eher zu ermöglichen, setzten wir bei einem Teil der Versuchsf flaschen außer dem *Bacterium f* auch eine Kahlmhefe (No. 5 unserer Sammlung) zu, bei andern nur das *Bacterium f* und bei einer 3. Reihe zum Vergleich nur den Kahlmpilz. Um dem letzteren die Entwicklung zu ermöglichen, wurden die betreffenden Flaschen in den ersten Tagen nur mit Wattestopfen verschlossen. Die Kahlmpilze entwickelten sich bei der Temperatur von 19° rasch, und nun wurden die Wattestopfen durch Gärverschlüsse ersetzt. Trotzdem durch die Kahlmhefe eine teilweise Entsäuerung stattfand, vermochte *Bacterium f* in diesem Weine mit 80,35 Gewichts-% Alkohol und 10,01 % Gesamtsäure (als Äpfelsäure) 0,34 % flüchtige Säure und 1,01 % Milchsäure nicht zu wachsen. Gleichzeitig wurde mit dem gleichen Wein derselbe Versuch ausgeführt; nur wurde der Säuregehalt des Weines durch reines Calciumkarbonat auf 6,80 % Gesamtsäure (als Äpfelsäure) herabgesetzt. Die nach ca. 6 Wochen vorgenommene Untersuchung ergab, daß auch hier die Bakterien nicht gewachsen waren, wie schon der mikroskopische Befund zeigte. Das Ergebnis der chemischen Untersuchung stimmte damit überein, wie folgende Zusammenstellung zeigt:

	Alkohol g im l	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l
Clävner Wein, steril	80,35	6,80	0,30
„ „ + Kahlm No. 5	64,28	6,60	0,61
„ „ + Bact. mannit. f	—	6,73	0,33
„ „ + Kahlm No. 5 + Bact. mannit. f.	—	6,47	0,74

Das Nichtgedeihen des *Bacteriums* wird man hier wohl dem Zusammenwirken dreier Faktoren zuschreiben dürfen, die alle eine Schwächung der Bakterien bewirken. Der verhältnismäßig hohe anfängliche Alkoholgehalt ein doch noch ziemlich hoher Säuregehalt und der Mangel an leicht assimilierbarer Nahrung. Durch Aufhebung des einen oder anderen Umstandes würde man den Bakterien voraussichtlich das Wachstum ermöglicht haben. In den folgenden Versuchen wurde daher eine noch weitergehende Entsäuerung vorgenommen und dem Wein etwas Zucker in Form einer kleinen Menge unvergorenen Traubensaftes zugeführt.

Zum ersten Versuche wählte man einen auf den Tretern vergorenen und im Faß bis zum Klarwerden aufbewahrten Spätburgunder-Wein (Clävner) mit 0,86 g Invertzucker, 73,36 g Alkohol, 7,61 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure), 0,36 g Essigsäure, 1,0 g Milchsäure und 24,2 g Extrakt im Liter. Nach Entsäuerung und Zusatz von etwas Räuschlingssaft, zeigte der Wein die in der Tabelle 20 angegebene Zusammensetzung. Nachdem der Versuchswein dann in die Gärflaschen à 400 ccm abgefüllt und, mit Korkstopfen verschlossen, sterilisiert war, fand eine starke Aussaat mit den 4 Rassen des *Bacterium mannitopæum* statt. Hierauf kamen die mit Gärverschlüssen versehenen Flaschen in den Brutraum mit ca. 19°. Die nach ca. 8 Wochen vorgenommene Untersuchung ergab folgendes:

Tabelle 20.

	Zucker	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Spätburgunderwein (Clävner), steril	10,47	67,36	2,96	0,14	2,81	1,57	32,4
„ „ + Bact. mannit. f	0,43	66,0	5,14	1,77	3,19	5,16	26,6
„ „ + Bact. mannit. k	0,38	65,5	4,87	2,15	2,51	6,16	24,4
„ „ + Bact. mannit. p	0,69	67,1	4,20	1,62	2,42	6,18	25,2
„ „ + Bact. mannit. t	0,34	67,0	5,63	2,41	2,98	6,80	22,5

Schon nach 10 Tagen zeigte sich bei sämtlichen Bakterien ein deutliches Depot und bei k und t ziemlich kräftige Gärung. Auch bei den übrigen stellte sich Gasentwicklung ein. Nach weiteren 10 Tagen hatten sich die Bakterien ziemlich abgesetzt und bildeten ein Depot von 3—4 mm Höhe bei f, t und p, von $\frac{1}{2}$ cm bei k. Bei der Untersuchung erwiesen sich sämtliche Weine als vollständig klar und von schön roter Farbe, etwas heller als der sterile, also ohne Bakterieneinwirkung gebliebene Wein. Die Bakterien haben keinen nachteiligen Einfluß auf Farbe und Klarheit ausgeübt. Dagegen war der Wein im Geruch und Geschmack sehr ungünstig verändert. Es trat deutlich Essigstich hervor, am wenigsten bei p. Auch sonst war der Geschmack unangenehm, besonders der Nachgeschmack. Man konnte einen deutlichen Mäuselgeschmack, d. h. Geruch nach Acetamid, wahrnehmen; am wenigsten war dieser bei p ausgeprägt. Die Weine aber zeigten weder die Erscheinung des Umschlagens, noch den eigentlichen Milchsäurestich, noch irgend einen Anklang an den Geschmack von bitteren Weinen. Nach dem hohen Gehalt an flüchtiger Säure und Milchsäure zu urteilen, wären die Weine allerdings als milchsäurestichig zu betrachten gewesen; es fehlten jedoch der für diese Krankheit so charakteristische säuerlich-süße Geruch und Geschmack. In anderen Fällen genügt zwar das Vorhandensein von viel Milchsäure und flüchtiger Säure noch nicht, um einen Wein als milchsäurestichig zu charakterisieren; nach dem Abbau der Säure enthalten manche Weine ziemlich viel Milchsäure und wenn nun in solchen durch Essigbakterien noch Essigsäure erzeugt wird, so wird man diese Beschaffenheit nicht als Milchsäurestich bezeichnen können. Unseres Erachtens kommt der Milchsäurestich nur dann zustande, wenn gleichzeitig Essigsäure und Milchsäure aus Zucker entstehen, wobei dann in der Regel auch jene eigentümlich riechenden und schmeckenden charakteristischen Verbindungen (Ester) gebildet werden. Wenn nun in gewissen Fällen des eben erwähnten Zuckerabbaues durch Bakterien diese Verbindungen nicht entstehen, so wird man, falls die erwähnte Entstehungsart erwiesen ist, doch vom Milchsäurestich sprechen können; in der Praxis der Weinbehandlung wird die Feststellung, ob es sich um Milchsäurestich handelt, allerdings oft schwierig sein.

Wie aus Tabelle 20 zu ersehen ist, haben alle 4 Bakterien den Zucker stark angegriffen, am wenigsten p; alle 4 haben viel flüchtige Säure und Milch-

säure gebildet, letztere im Verhältnis zur flüchtigen Säure in auffallend großer Menge. Milchsäure ist wohl auch durch Abbau des ursprünglich vorhandenen sauren äpfelsauren Calciums entstanden. Dafür trat dann ein Teil derselben in Verbindung mit dem freiwerdenden Calcium. Letzteres erhellt aus dem Vergleich der Gehalte an nicht flüchtiger Säure und Milchsäure. Auch auf die Bildung von etwas Mannit kann geschlossen werden, wenn man die Abnahme des Zuckers mit derjenigen des Extraktes vergleicht.

Sowohl die äußere Beschaffenheit des Weines als auch die nachgewiesenen chemischen Umsetzungen erwecken den Eindruck, daß diese Bakterien im wesentlichen sich darauf beschränkten, den dargebotenen Zucker und das äpfelsaure Salz zu zersetzen, daß sie aber nicht tiefergreifende Umsetzungen hervorzurufen vermögen, wie solche z. B. beim Umschlagen eintreten.

In gleicher Weise wie den vorigen Versuch führten wir einen solchen mit Wein aus Trauben der Gutedelsorte durch; der Traubensaft wurde sterilisiert und dann mit Reihefe vergoren. Der so gewonnene Wein enthielt 90,04 g Alkohol, 6,01 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure), 0,32 g flüchtige Säure (als Essigsäure), 1,69 g Zucker und 16,89 g Extrakt pro Liter. Auf 14 Liter dieses Weines wurde ein Liter unvergorener Gutedelsaft zugefügt und das Gemisch mit reinem Calciumkarbonat stark entsäuert. Die weitere Versuchsanstellung war dieselbe wie beim vorigen Versuche. Versuchsdauer 2 Monate, Temperatur 19°. Schon nach 10 Tagen trübten sich die Weine; es war auch eine schwache Gasentwicklung zu beobachten, die aber nie so kräftig wurde wie beim vorigen Versuch. Nach dem Absetzen der Bakterien erwies sich auch das Depot geringer, das nur eine Mächtigkeit von 2—3 mm und bei p eine solche von 1 mm erreichte. In der Klarheit und Farbe zeigten sich die Weine nach Beendigung des Versuches, d. h. nach 8 Wochen, tadellos. Während der nicht mit Bakterien versetzte (sterile) eine gelbliche Färbung aufwies, waren sie von einem schön grünlich-gelben Ton, wie er bei diesen Weinen beliebt ist. Im Geruch und Geschmack machte sich Essigstich bemerkbar, doch nur schwach, und nicht so aufdringlich wie beim Clävner. Dagegen waren wiederum der Mäuselgeschmack und Acetamidgeruch recht deutlich, besonders bei Bacterium f und t.

Tabelle 21.

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Gutedelwein, steril	17,5	2,06	0,26	1,77	1,12	29,9
„ + Bact. mannit. f	5,10	4,60	1,62	2,82	2,92	25,9
„ + Bact. mannit. k	7,15	4,00	1,40	2,46	3,15	26,4
„ + Bact. mannit. p	9,27	3,67	1,11	2,45	2,58	27,4
„ + Bact. mannit. t	5,33	4,54	1,64	2,74	3,26	26,0

Die chemische Untersuchung zeigte, daß in diesem Wein von den Bakterien mindestens ebenso viel Zucker zersetzt wurde wie beim Clävner; nur p blieb etwas zurück. Trotzdem wurde etwas weniger flüchtige Säure und eine beträchtlich geringere Menge Milchsäure gebildet. Der Zucker muß hier zur Hauptsache in andere Verbindungen übergeführt worden sein, und zwar

voraussichtlich in Mannit, worauf die geringe Abnahme des Extraktgehaltes hinweist. Dieses Verhalten gibt uns Veranlassung, hier eine Beziehung von allgemeiner Bedeutung zu berühren. Diese sowie andere Versuche führen uns zu der Ansicht, daß das gleiche Bacterium in verschiedenen beschaffenen Medien eine chemische Substanz nicht immer in der gleichen Weise zerlegt. Bei dem Clävner z. B. sind durch das Bacterium t 10 g Zucker abgebaut worden unter Bildung von 2,3 g Essigsäure und 5,2 g Milchsäure, beim Gutedelwein 12,2 g Zucker unter Bildung von nur 1,4 g Essigsäure und 2,14 g Milchsäure. Dagegen entspricht beim Clävner dem Zuckerverlust von 10 g auch ein Extraktverlust von 10 g; beim Gutedelwein dem Zuckerverlust von 12,2 g nur ein Extraktverlust von 3,9 g. Beim ersteren hat offenbar fast gar keine Mannitbildung stattgefunden, beim zweiten wohl eine erhebliche. Da hier nur ein Teil des Zuckers zur Vergärung gelangte und zwar nach unseren früheren Darlegungen wahrscheinlich in erster Linie Lävulose, so wäre denkbar, daß eine direkte Verwandlung dieser Zuckerart in Mannit nach der Formel von D u c l a u x: $13 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ H}_2\text{O} = 12 \text{ C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6 + 6 \text{ CO}_2$ ohne Bildung viel Milchsäure und Essigsäure stattgefunden hat. Beim Clävner dagegen ist sowohl Lävulose als Dextrose umgesetzt worden, und aus letzterer dann wahrscheinlich ziemlich viel der genannten Säuren entstanden. Doch sind wir uns wohl bewußt, daß damit die Verschiedenheit der Umsetzungsprodukte in diesen beiden Weinen noch nicht genügend erklärt ist.

Sowohl im Clävner- als Gutedelwein fanden sich die 4 Bakterienrassen in Form von langen, meist nicht eingeteilten Fäden und kurzen Stäbchen; bei k waren die Fäden vielfach geknickt und miteinander verflochten. Im Anschluß an das auf p. 196 (Tabelle 19) Gesagte sei hervorgehoben, daß hier die gleichen Bakterien, die dort in Reinholzbirnsaft kurz gegliederte Fäden bildeten, in den beiden Weinen meist ungegliederte Fäden aufwiesen.

Nach den Angaben von A. K o c h (1) und S e i f e r t (2) konnte man erwarten, das Wachstum von Bakterien im Wein außer durch teilweise Entsäuerung oder eine kleinere Zuckerzugabe auch durch das Belassen des Hefetrubes fördern zu können, indem auf diese Weise ein günstiges Nährmedium für die Bakterien geschaffen werde. Es wurde darum mit einem mit der Reinhefe Steinberg 3 vergorenen G u t e d e l w e i n folgender Versuch angestellt.

In einen Teil der Versuchsflaschen kam der klar abgesetzte Wein ohne Hefe, in andere der Wein mit dem entsprechenden Teil der Hefe, die durch Sterilisieren abgetötet wurde, und in eine dritte Serie Wein mit Hefe, ohne diese durch Sterilisation vorher zu töten. In alle Gefäße wurde dann das Bacterium f ausgesät. Es zeigte sich jedoch nirgends Wachstum, selbst im Laufe von 10 Monaten nicht. Die Beschaffenheit des Weines war offenbar zu ungünstig. Derselbe enthielt ca. 80 g Alkohol, 7,27 g Gesamtsäure als Äpfelsäure, 1,10 g flüchtige Säure als Essigsäure im Liter.

Es wurde deshalb noch ein zweiter Versuch mit G u t e d e l w e i n derselben Beschaffenheit, aber nach teilweiser Entsäuerung, angestellt. Während nun hier andere Bakterien, von denen wir später berichten werden, gut gediehen, war das bei dem Mannitbacterium f wiederum nicht der Fall. Es vermochte nur unbedeutende Veränderungen hervorzurufen, wie aus nachfolgender Zusammenstellung zu ersehen ist. Dauer des Versuchs 10 Monate; Temperatur 19°.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milch- säure g im l
Gutedelwein, vor der Infektion (teilweise entsäuert) .	3,40	1,13	—
„ ohne Hefe, mit Bact. f	3,47	1,16	1,00
„ mit Hefe (sterilisiert) + Bact. f	3,67	1,22	1,12
„ mit Hefe (lebend) + Bact. f	3,34	1,19	0,66

Ein gleicher Versuch wurde auch mit Wein der Rebsorte „Räuschling“ durchgeführt, wobei man wieder vom unvergorenen Saft ausging, den man zuerst mit der Hefe „Neuenburg“ vergären ließ. Wiederum vermochten die Bakterien f in dem nicht entsäuerten Wein wohl infolge des hohen Säuregehaltes von 8,61‰ Äpfelsäure nicht zu wachsen, selbst während 10 Monaten nicht, dagegen wohl, wenn dieser Wein durch reines Calciumkarbonat auf 5,61‰ entsäuert wurde; es mögen infolgedessen noch kurz die Ergebnisse dieses Versuches zusammengestellt werden. Dauer des Versuchs 86 Tage; Temperatur 19°.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milch- säure g im l
Räuschlingswein, ohne Bact. f	5,61	0,46	0,92
„ ohne Hefe, mit Bact. f	4,60	1,33	2,74
„ mit Hefe (sterilisiert) + Bact. f	5,54	1,18	2,02
„ mit Hefe (lebend) + Bact. f	5,61	1,20	2,02

In diesem Wein vermochte nun das Bacterium f zu wachsen und Umsetzungen zu verursachen; die von Koch und Seifert angenommene günstige Wirkung durch anwesenden Hefetrub hat sich dagegen nicht gezeigt. Auf Grund der bisher mitgeteilten Resultate können wir annehmen, daß hier in erster Linie das saure äpfelsaure Calcium unter Bildung von Milchsäure und etwas Essigsäure abgebaut wurde. Doch war dies wahrscheinlich nicht der einzige Vorgang, denn hierbei wäre verhältnismäßig wenig flüchtige Säure gebildet worden und es hätte der Gesamtsäuregehalt abgenommen. Es fand also wahrscheinlich noch eine Umsetzung von unvergoren gebliebenem Zucker statt. Die Kostprobe der Weine ließ eine eigentliche Erkrankung derselben nicht erkennen.

Wir haben in diesem Kapitel bereits von den Eigenschaften und der Entstehung milchsäurestichiger Getränke gesprochen. Bei den Traubenweinen sind trotz Zusatz von etwas Zucker und den den Milchsäurestich verursachenden Bakterien wohl Milchsäure und Essigsäure gebildet worden, nicht aber der eigentümlich süßlich saure Geruch und Geschmack. Wir hofften auch diese Erscheinung erzielen zu können, indem wir einem mit Reinhefe teilweise vergorenen Theilersbirnwein das Bacterium mannitopœum t zusetzten. Es trat lebhafte Kohlensäureentwicklung und Bildung von Essigsäure und Milchsäure ein.

Die beträchtliche Menge von Milchsäure kann nicht etwa nur aus Zucker gebildet worden sein, sonst würde dadurch der Gesamtsäuregehalt eine entsprechende Erhöhung erfahren haben. Da dies nicht geschehen, so muß auch

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milch- säure g im l
Obstwein ohne Bacterium	5,15	0,43	1,12
„ mit Bact. mannitol. t	5,90	1,64	4,94

eine Abnahme an ursprünglicher Säure, also ein Abbau derselben unter Bildung von Milchsäure stattgefunden haben. Es waren also die beiden Vorgänge, die beim Milchsäurestich mitwirken, hier vereinigt. Dennoch trat wiederum der dieser Krankheit eigene Geruch und Geschmack nicht auf; dagegen war wieder ein deutlicher Mäuselgeschmack wahrzunehmen, und wir dürfen auf Grund all der bisher erwähnten Fälle diese letztere Erscheinung mit vollem Recht als eine durch Bakterien verursachte Weinkrankheit bezeichnen.

Aus den in diesem Abschnitt mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß in sehr säurereichen Weinen die Rassen von *Bacterium mannitolpæum* nicht gedeihen, so im Clävner mit 10,01‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure), aber auch nicht, wenn der Säuregehalt desselben auf 6,80‰ erniedrigt wurde, oder in einem Gutedelwein mit 7,27‰ Gesamtsäure, im Räuschlingswein mit 8,61‰. Wenn unter Umständen in einem säurearmen Wein (wie z. B. im entsäuerten Gutedelwein mit 3,40‰ Gesamtsäure) die Bakterien nicht zu wachsen vermögen, so sind dann eben andere Faktoren ausschlaggebend, wie in dem angeführten Beispiel der hohe Alkoholgehalt von 10 Vol.-Proz. oder auch der Mangel an geeigneter Nahrung (Zucker, vielleicht auch Pentosen).

In den übrigen angeführten Fällen, wo stark entsäuerten Weinen Zucker zugesetzt wurde oder derselbe noch vorhanden war, (entsäuert Clävner- und Gutedelwein mit Zuckerzusatz, und noch zuckerhaltiger Obstwein) erzeugten die Bakterien Milchsäure, Essigsäure und Mannit, die beim Milchsäurestich regelmäßig auftretenden Produkte, unter den obwaltenden Umständen nicht aber den charakteristischen Geruch der diese Krankheit zeigenden Weine. Dagegen machte sich regelmäßig der Mäuselgeschmack bemerkbar, so daß wir wohl berechtigt sind, letztere Erscheinung als eine durch Bakterien verursachte Weinkrankheit aufzufassen.

II.

Gruppe des *Bacterium gracile*.

A. Morphologisches Verhalten.

Aus spontan vergorenem Reinholzbirnenwein vom Jahre 1902 und zwar aus einer im Trub dieses Weines aufgefundenen Bakterienblase züchteten wir ein *Bacterium*, das sich schon durch seine Zartheit vom *Bacterium mannitolpæum* deutlich unterschied. Wir nannten es dieser Eigenschaft wegen *Bacterium gracile* (Müller-Thurgau; 6). Da es beim näheren Studium auch in physiologischer Beziehung von denen der

ersten Gruppe stark abweichende Eigenschaften zeigte, so hielten wir es für gerechtfertigt, noch in anderen Getränken, namentlich in kranken Weinen, nach diesem Bacterium zu suchen bzw. dasselbe daraus zu züchten. So haben wir schließlich 5 solcher Bakterien im Laufe der Jahre mehr oder weniger eingehend studiert. Wir fassen sie als Art zusammen; in Anbetracht der geringen physiologischen und namentlich morphologischen Verschiedenheiten lassen wir es aber dahingestellt, ob man sie als verschiedene Rassen auffassen darf. Jedenfalls sind die Unterschiede geringer als bei den von uns zu *Bacterium mannitopectum* gezählten Rassen. Immerhin führen wir sie in den folgenden Darlegungen unter verschiedener Bezeichnung auf, das hauptsächlich studierte Bacterium als *Bacterium gracile a*; sodann ein aus einem teilweise entsäuerten spontan vergorenen 1906er Wein der Traubensorte „Malinger“ als *Bacterium gracile g*; ein weiteres aus einem als krank eingeschickten Schaffhauser Rotwein gewonnenes als *Bacterium gracile s*, ein viertes aus einem vergorenen und wieder trüb gewordenen Rotwein 1909 von Karthaus Ittingen als *Bacterium gracile i* und endlich eines aus einem Äpfelsaft, der einen erheblichen Säurerückgang zeigte, als *Bacterium gracile w*. — Auch dieses Bacterium wurde bezüglich seines morphologischen Verhaltens in den nämlichen Medien studiert, wie *Bacterium mannitopectum*, also sowohl in flüssigen Nährböden als auch in und auf Nährgelatine.

In dem entsäuerten Gutedelweine bildete *Bacterium gracile a* Kurzstäbchen und hie und da einen längeren Faden; Kurzstäbchen und Fäden sind $0,5\ \mu$ dick, die ersteren ca. $0,75\ \mu$ lang, so daß sie oft kokkenähnlich erscheinen, um so mehr als die Kurzstäbchen an den Enden stark abgerundet sind. *Bacterium gracile g* verhielt sich übereinstimmend, nur fehlten die längeren Fäden (Taf. I, Fig. 4). Auch *Bacterium gracile s* zeigte die gleichen Dimensionen der Kurzstäbchen. Daneben fanden sich noch längere kurzgegliederte Fäden. Ganz anders war das Aussehen der Bakterien in einem entsäuerten sterilisierten Schellerbirnsaft, den man zuerst mit *Bacterium gracile* impfte und etwas später mit Reihefe vergären ließ. Auf dem abgesetzten Hefetrub bildeten die zugesetzten Bakterien a, g und s jeweils in den Flaschen ziemlich stark gewölbte weiße Kolonien von mehr als 1 cm Durchmesser, in denen die Bakterien als sehr lange, dicht ineinander verflochtene, häufig geknickte kurzgegliederte, knäuelbildende Fäden erschienen (Taf. I, Fig. 5). Dicke der Fäden $0,5$ — $0,6\ \mu$. Trotz sorgfältiger Beobachtung in den verschiedenartigen Nährflüssigkeiten und auf festen Böden konnte auch bei diesem Bacterium niemals Sporenbildung beobachtet werden; ebenso war in keinem Falle die Fähigkeit der Selbstbewegung zu bemerken. Gegenüber der Gramschen Färbung verhielten sie sich positiv. In gewissen Nährflüssigkeiten, besonders in Obstweinen, vermag auch das *Bacterium gracile* ähnlich wie *Bacterium mannitopectum* Zoogloeen und Blasen zu bilden.

In den Gelatinekulturen, Tiefenkolonien wie Riesenkolonien, bei denen nirgends eine Verflüssigung eintrat, zeigten die Bakterien übereinstimmendes Aussehen. Es waren vereinzelte Kurzstäbchen und z. T. solche zu kurzen, mehrfach geknickten Fäden vereinigt. Dicke der Stäbchen $0,4$ — $0,5\ \mu$; Länge der Kurzstäbchen $0,75\ \mu$. Sehr häufig fanden sich 2 Kurzstäbchen miteinander vereinigt.

Die Tiefenkolonien (Taf. II, Fig. 24) in der Nährgelatine sind meist kugelförmig, ganzrandig und erscheinen in durchfallendem Licht ho-

mogen, am Rande hellgelb, in der Mitte mehr gelbbraun. Wenn sie in geringer Zahl vorhanden sind, können sie ziemliche Größe erreichen. In einem Falle wurde bei einer Tiefenkolonie ein Durchmesser von 250 μ festgestellt. Von denjenigen der Art *Bacterium mannitolæum* unterscheiden sich die Kolonien dadurch, daß sie weniger rasch wachsen, gewöhnlich einfach und nicht zusammengesetzt sind, wie dies bei jenen öfters beobachtet wird und im Innern homogen erscheinen, während sie bei jenen eine körnige Beschaffenheit erkennen lassen, was wohl mit der Größe der Einzelbakterien zusammenhängt.

Die Oberflächenkolonien (Taf. II, Fig. 10) sind nierenförmig, ganzrandig, im durchfallenden Licht am Rande weiß, gegen innen zu braun, auf der Oberfläche glatt; sie unterscheiden sich wesentlich, wie aus einem Vergleich der Figuren deutlich hervorgeht, von jenen des *Bacterium mannitolæum*.

Die Riesenkolonien (Taf. II, Fig. 16—18), deren Herstellung auf p. 160 beschrieben ist, sind äußerst zart und bedecken die Gelatine wie ein zartes Häutchen. Sie sind kreisförmig, am Rande etwas erhaben, erscheinen dem bloßen Auge als ganzrandig und nur bei Vergrößerungen läßt sich eine feine Kerbung des Randes erkennen, die bei *Bacterium gracile a* etwas gröber ist als bei *Bacterium gracile g*. Auch hierin unterscheiden sich diese Bakterien von denjenigen des *Bacterium mannitolæum*, ebenso in der Größenzunahme, indem ihre Riesenkolonien einen Durchmesser von 2—3,5 mm (*Bacterium gracile a* und *Bacterium gracile g*), die der *Bacterium mannitolæum*-Gruppe hingegen in der gleichen Zeit einen solchen von 3,5—7 mm erreichten. Bei letzteren waren die Kolonien zudem bedeutend dicker.

Auch in den Strich- und Stichkulturen entwickelten sich die Bakterien *a* und *g* weniger kräftig als die Rassen von *Bacterium mannitolæum*. Sie bildeten in der Strichkultur einen deutlichen, aber dünnen zarten Strich, der bei *Bacterium gracile g* auffallend stark opaleszierend war, bei *Bacterium a* diese letztere Eigenschaft erheblich weniger aufwies. In der Stichkultur war die Vegetation im oberen Teil zusammenhängend, im unteren Teil perlschnurartig, wie bei *Bacterium mannitolæum*, nur erschien sie bedeutend zarter. Auch in den Strich- und Stichkulturen findet eine Verflüssigung nicht statt.

Die Bakterien dieser Gruppe unterscheiden sich also von denen des *Bacterium mannitolæum* nicht nur durch den ausgeprägten zarteren Bau der Einzelbakterien, sondern auch durch ein bedeutend geringeres Wachstum in und auf der Gelatine. Auch bei der Kultur in flüssigen Medien tritt dieser Unterschied scharf hervor. Während *Bacterium mannitolæum* in den Versuchsfラスchen ein reichliches Depot bis zu $\frac{1}{2}$ cm Höhe bildet, vermögen die Bakterien der Gruppe *Bacterium gracile* oft kaum den Boden zu decken, wobei zu bemerken ist, daß von diesen *g* und *i* eine kräftigere Entwicklungsfähigkeit besitzen. Während die Vertreter von *Bacterium mannitolæum* auf dem Hefetrub oft größere Flocken bis zu mehreren cm Durchmesser bilden, treten solche bei *Bacterium gracile* nur selten auf und erreichen nur eine geringe Größe bis

höchstens $\frac{1}{2}$ cm Durchmesser. Wegen ihrer geringen Größe und feineren Verteilung sinken die Bakterien dieser Gruppe weniger schnell zu Boden und die Flüssigkeiten, in denen sie sich entwickeln, bleiben dementsprechend erheblich länger trüb als bei *Bacterium mannitolpœum*.

B. Physiologisches Verhalten von *Bacterium gracile*.

Die im Nachfolgenden zu beschreibenden Versuche wurden zu gleicher Zeit und mit den gleichen Lösungen durchgeführt wie diejenigen mit dem *Bacterium mannitolpœum*, so daß wir davon absehen können, die Herstellung und Beschaffenheit der Kulturmedien jeweils eingehend zu schildern. Zunächst wurden die in Wasserbirnsaft herangezuchteten Bakterien a, g und s in die auf p. 161 angeführte erste künstliche Nährlösung (aus Äpfelsäure, Asparagin, Magnesium- und Dikaliumphosphat, Chlornatrium und Lävulose) gebracht, wo sie jedoch wie das *Bacterium mannitolpœum* nicht gediehen. In der 2. Lösung (mit Pepton, Dikaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Chlorcalcium, Lävulose und etwas Äpfelsäure) wuchs *Bacterium gracile* a und verursachte hier Umsetzungen, wenn auch keine tiefgehenden; dasselbe war der Fall in dieser Lösung bei Zusatz von 1 Proz. äpfelsaurem Kalium.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milch- säure g im l
Nährlösung 2, steril	0,47	0,11	0,68
„ 2, + <i>Bact. gracile</i> a	0,54	0,32	1,12
„ 2, + 1% äpfelsaures Kalium, steril . . .	0,47	0,19	0,54
„ 2, + 1% äpfelsaures Kalium + <i>Bact.</i> <i>gracile</i> a	0,20	0,19	0,79

Der Milchsäuregehalt hat da, wo das *Bacterium* wirkte, etwas zugenommen; da aber eine dementsprechende Zunahme an nicht flüchtiger Säure nicht stattfand, sondern eine Abnahme, so ist damit bewiesen, daß das *Bacterium* die Äpfelsäure abgebaut und darin ein wesentlich anderes Verhalten gezeigt hat als das *Bacterium mannitolpœum* f in den gleichen Lösungen.

1. Verhalten gegenüber den Hexosen: Dextrose, Lävulose und Galaktose.

Diese Versuche, zu denen die auf p. 163 beschriebenen Lösungen dienten, wurden in gleicher Weise wie mit dem *Bacterium mannitolpœum* f durchgeführt, in ähnlichen Gefäßen, bei derselben Temperatur und während derselben Zeit. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Untersuchung zusammengestellt.

Alle 3 Zuckerarten wurden von dem *Bacterium* zersetzt unter Bildung von Kohlensäure, Essigsäure und Milchsäure und außerdem bei Dextrose und Galaktose von Alkohol, sowie bei Lävulose von Mannit. Am vollständigsten wurde die Lävulose umgesetzt, am wenigsten die Galaktose. Das Verhältnis von Milchsäure und Essigsäure ist bei den 3 Zuckerarten verschieden. Auf 100 Teile Milchsäure kommen bei der Galaktose 34 Teile Essig-

säure, bei der Dextrose 41 und bei der Lävulose gar 69 Teile. Der größere Teil der Milchsäure ist wohl aus den Zuckerarten entstanden, dagegen ist nicht zu übersehen, daß dieses Bacterium auch aus dem Hefeauszug ohne Zuckerzusatz etwas Milchsäure bilden kann, teils aus der kleinen Menge zugesetzter Äpfelsäure, zum Teil wohl auch aus anderen Verbindungen. Die beträchtliche aus Lävulose gebildete Menge Mannit läßt erkennen, daß das Bacterium gracile auch ein Mannitbacterium ist.

Tabelle 22.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Alkohol g im l	Mannit g im l	Zucker als Invertz. g im l
Hefeauszug I + Dextrose, steril . .	0,74	0,28	0,43	0,36	0,0	—	19,48
„ I „ + Bact. grac. a	4,75	1,98	2,57	4,50	1,40	0,0	7,28
Hefeauszug II + Lävulose, steril . .	0,77	0,34	0,40	0,90	0,0	—	23,96
„ „ + Bact. grac. a	6,36	3,14	2,91	4,94	—	6,30	2,22
Hefeauszug III + Galakt., steril . .	0,47	0,27	0,17	0,68	0,0	—	ca. 20
„ III „ + Bact. gracile a (1) . . .	1,27	0,65	0,56	1,80	—	0,0	—
„ III „ + Bact. gracile a (2) . . .	1,54	0,60	0,88	1,72	0,86	0,0	—
Hefeauszug I ohne Zuckerzus., steril	0,74	0,28	0,43	0,36	0,0	—	19,48
„ I „ „ + Bact. gracile a	0,80	0,30	0,47	1,46	—	—	—
Hefeauszug III ohne Zuckerz., steril	0,67	0,27	0,37	0,68	—	—	—
„ III „ „ + Bact. gracile a	0,54	0,31	0,20	1,12	—	—	—

Dennoch können wir es nicht mit dem Bacterium mannitopœum vereinigen, da es von diesem, abgesehen von den morphologischen Unterschieden, auch sonst noch stark abweicht, nämlich in der Fähigkeit des energischen raschen Abbaues von Äpfelsäure, einer Eigenschaft, die für dieses Bacterium ebenso charakteristisch ist, wie die Mannitbildung für das Bacterium mannitopœum. Durch das Bacterium gracile a wurde die Dextrose weniger weit umgesetzt als durch das Bacterium mannitopœum in früheren Versuchen. Während die beiden Bakterien gegenüber der Lävulose sich ausnahmsweise ziemlich gleich verhielten, Bacterium gracile aber verhältnismäßig etwas weniger flüchtige Säure bildete, hat das Bacterium mannitopœum in anderen Versuchen seine bedeutende Fähigkeit, Mannit zu bilden, unzweifelhaft gezeigt. Galaktose, die das Bacterium mannitopœum ebenso stark angriffen, wie die beiden anderen Zuckerarten, wurde durch Bacterium gracile nur unbedeutend zersetzt. In der Lävuloselösung erzeugte Bacterium gracile a einen deutlichen Mäuselgeschmack.

Aus diesem Versuche geht hervor, daß das Bacterium gracile a Dextrose, Lävulose und Galaktose zu vergären vermag, Galaktose am wenigsten weitgehend, Lävulose am leichtesten und daß ähnlich wie bei Bacterium mannitopœum dabei Essigsäure und Milchsäure, bei Dextrose und

Galaktose außerdem noch Alkohol und bei Lävulose Mannit entstehen.

2. *Bacterium gracile* in Lösungen von Saccharose, Laktose, Maltose und Raffinose.

Bezüglich der Versuchsanstellung kann auf p. 167 verwiesen werden, da in ganz gleicher Weise wie dort verfahren wurde. Versuchsdauer und Gärtemperatur waren die nämlichen.

Tabelle 23.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Alkohol g im l	Zucker als Invertz. g im l
Hefeauszug IV + Saccharose, steril . . .	0,47	0,34	0,10	0,56	—	17,16
„ IV „ + <i>Bact. gracile</i> a	0,67	0,41	0,22	1,34	0,25	—
„ IV ohne „ + <i>Bact. gracile</i> a	0,60	0,42	0,14	1,34	—	—

Wie aus diesen Ergebnissen zu ersehen ist, vermochte das *Bacterium gracile* a den Rohrzucker nicht anzugreifen. Die Zunahme an Milchsäure ist, wie der Kontrollversuch mit Hefeauszug ohne Saccharose beweist, auf die Umsetzung von Substanzen (Äpfelsäure usw.) zurückzuführen, die im Hefeauszug enthalten waren. Ein ganz gleiches Resultat ergaben die Versuche mit Maltose, Laktose und Raffinose. Da zur Aussaat die Bakterien im besten Entwicklungsstadium (3 Wochen alte Kultur in Wasserbirnsaft) verwendet wurden, so kann die Ursache dieses negativen Befundes nicht an ungenügender Lebensfähigkeit derselben liegen. Ebenso wenig kann die Lösung für das Bakterienwachstum ungünstig beschaffen gewesen sein; denn das *Bacterium mannitolpœum* f entwickelte sich darin sehr gut (siehe Tabelle 2) und ebenso auch eine andere, später noch zu besprechende Bakterienart. Es darf wohl der Schluß gezogen werden, daß das *Bacterium gracile* a Saccharose, Maltose, Laktose und Raffinose nicht anzugreifen vermag und sich in dieser Beziehung also grundsätzlich von *Bacterium mannitolpœum* unterscheidet.

3. Verhalten des *Bacterium gracile* gegenüber den Pentosen: l-Arabinose, Xylose und Rhamnose (Isodulcit).

Auch hier wurden die Versuche in gleicher Weise angestellt wie mit dem *Bacterium mannitolpœum* (p. 171), mit denselben Lösungen, bei der gleichen Temperatur und während der nämlichen Zeit.

Die Ergebnisse bei der Arabinose lassen deutlich erkennen, daß diese Pentose vom *Bacterium gracile* a nicht angegriffen wird. Die Zunahme an Milchsäure ist nicht auf die Umsetzung der Arabinose zurückzuführen; wie das Verhalten des Hefeauszuges ohne Arabinose zeigt, stammt die geringe neu entstandene Milchsäuremenge von Bestandteilen des Hefeauszuges. In gleicher Weise vermochte das *Bacterium gracile* a

Tabelle 24.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug III + 12,5 ⁰ / ₁₀₀ Arabinose, steril	0,50	0,27	0,20	0,68
„ III „ „ + Bact. gracile a	0,54	0,34	0,17	1,00
„ III ohne „ + Bact. gracile a	0,54	0,31	0,20	1,12

auch die anderen Pentosen (Xylose und Rhamnose) nicht anzugreifen. Unser *Bacterium gracile a* stimmt also mit dem Mannitferment von Gayon und Dubourg darin überein, daß es die l-Arabinose nicht vergärt, unterscheidet sich aber von dem letzteren dadurch, daß dieses die Xylose anzugreifen vermag. Das *Bacterium gracile a* unterscheidet sich also auch darin wesentlich vom *Bacterium mannitopœum*, daß es l-Arabinose, Xylose und Rhamnose nicht angreift, während *Bacterium mannitopœum* die ersteren beiden Pentosen, l-Arabinose und Xylose, kräftig zu vergären vermag.

4. *Bacterium gracile* und die Glukoside: α Methylglukosid, Amygdalin und Phloridzin.

Bezüglich der Versuchsanstellung sei auf das Verfahren bei *Bacterium mannitopœum* (p. 173) verwiesen. Nochmals möge hervorgehoben sein, daß die Glukoside erst nach dem letzten Sterilisieren zugefügt wurden, um eine Spaltung durch den sauer reagierenden Hefeauszug in der Wärme zu vermeiden. Auch Versuchsdauer und Gärtemperatur waren die dort erwähnten.

Tabelle 25.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug III + ca. 12,5 ⁰ / ₁₀₀ α -Methylglukosid, steril	0,50	0,27	0,20	0,68
„ III „ „ + Bact. gracile a	3,95	1,56	2,24	3,60
Hefeauszug VII + ca. 20 ⁰ / ₁₀₀ Amygdalin, steril	0,73	0,36	0,33	0,61
„ VII „ „ + Bact. gracile a (1)	0,77	0,35	0,38	1,34
„ VII „ „ + Bact. gracile a (2)	0,94	0,75	0,11	1,52
Hefeauszug V + ca. 10 ⁰ / ₁₀₀ Phloridzin, steril	0,50	0,27	0,20	0,54
„ V „ „ + Bact. gracile a (1)	0,74	0,30	0,41	0,67
„ V „ „ + Bact. gracile a (2)	0,67	—	—	—
Hefeauszug III (ohne Glukosid), steril	0,67	0,27	0,37	0,68
„ III „ „ + Bact. gracile a	0,54	0,31	0,20	1,12
Hefeauszug V (ohne Glukosid), steril	0,46	0,27	0,16	0,54
„ V „ „ + Bact. gracile a	0,90	0,43	0,43	1,00

Im Laufe des 5 Wochen dauernden Versuches vermochte das *Bacterium gracile* α Methylglukosid in weitgehendem Maße zu spalten und dann selbstverständlich die frei werdende Glukose zu vergären. Die Umsetzungsprodukte zeigten mit den bei *Bacterium mannitopæum* erzielten große Übereinstimmung, was nicht überraschen kann, da wahrscheinlich die ganze Glukosidmenge gespalten wurde und die Glukose von beiden Bakterien in gleicher Weise vergoren wird. Wesentlich verschieden verhielt sich *Bacterium gracile* α in dem Amygdalin enthaltenden Hefeauszug. Während der fünfwochentlichen Versuchsdauer fand so gut wie keine Umsetzung statt; die geringe Zunahme an Milchsäure kann auf die ausgesprochene Fähigkeit des *Bacterium gracile*, die im Hefeauszug enthaltenen Säuren und Salze abzubauen, zurückgeführt werden. Bei lang andauernder Einwirkung (34 Wochen) ließ sich eine schwache unzweifelhafte Umsetzung des Amygdalins erkennen (2) an der geringen Zunahme an flüchtiger Säure und Milchsäure, sowie am schwach auftretenden Geruch nach Bittermandelöl. Daß nicht etwa während dieser langen Versuchsdauer vielleicht infolge der sauren Reaktion des Hefeauszuges eine Spaltung des Glukosides eintrat, geht aus einem gleichzeitig angestellten, in der Folge noch mitzuteilenden Versuche mit einem *Micrococcus* hervor, bei dem in der gleichen Lösung keinerlei Bildung von flüchtiger Säure und Milchsäure festzustellen war und bei dem auch der Bittermandelölgeruch nicht in geringster Weise sich bemerkbar machte. Die Amygdalin spaltende Fähigkeit, die Emulsinbildung, ist bei *Bacterium gracile* α aber doch beträchtlich geringer als bei *Bacterium mannitopæum* (Tabelle 6).

Von den 3 verwendeten Glukosiden vermag *Bacterium gracile* das α Methylglukosid kräftig abzubauen, unter Bildung von viel flüchtiger Säure und Milchsäure, das Amygdalin nur in geringem Maße unter Entwicklung von einer geringen Menge von Bittermandelöl, und das Phloridzinger nicht.

5. *Bacterium gracile* α in Lösungen von Mannit, Dextrin und Pepton Witte.

Da das *Bacterium gracile* keine von diesen 3 Verbindungen anzugreifen vermochte, kann bezüglich der Versuchsanstellung einfach auf p. 175 verwiesen werden, wo sie des näheren beschrieben ist. Auch Versuchsdauer und Temperatur sind die dort angegebenen. Bei dem Versuche mit Mannit hat *Bacterium gracile* α in der Lösung eine geringe Zunahme (0,22 ‰) von Milchsäure verursacht, gegenüber dem mit *Bacterium gracile* geimpften Hefeauszug ohne Mannit. Wir glauben aber nicht berechtigt zu sein, hieraus auf eine Umsetzung des Mannits zu schließen, sondern denken eher an eine Beeinflussung der Milchsäurebestimmung durch diese Substanz.

6. Verhalten des *Bacterium gracile* α gegenüber Äpfelsäure und äpfelsauren Salzen.

Welche Versuche durchgeführt wurden, läßt sich aus nachfolgender Tabelle 26 ersehen. Die Versuchsanstellung selbst war wieder die gleiche wie bei *Bacterium mannitopæum* f (p. 176). Mit Ausnahme der übrigen Versuche, wo mit Äpfelsäure schwach angesäuerter Hefeauszug

zur Verwendung kam, wurde bei dem Versuch mit Äpfelsäure etwas anders verfahren, indem man hier einem neutralen Hefeauszug die beabsichtigten Mengen Äpfelsäure zusetzte.

Tabelle 26.

	Gesamt-säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milch-säure g im l
Hefeauszug VIII mit 2,27 ⁰ / ₁₀₀ Äpfelsäure, steril	2,27	0,43	1,80	0,54
„ VIII „ „ „ „ + Bact. gracile a (1)	1,47	0,62	0,79	2,02
„ VIII „ „ „ „ + Bact. gracile a (2)	1,40	—	—	—
Hefeauszug VIII mit 4,68 ⁰ / ₁₀₀ Äpfelsäure, steril	4,69	0,43	4,22	0,54
„ VIII „ „ „ „ + Bact. gracile a (1)	2,54	0,71	1,76	3,60
„ VIII „ „ „ „ + Bact. gracile a (2)	2,61	—	—	—
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ neutr. äpfels. Kalium, steril . .	0,37	0,23	0,12	0,66
„ III „ „ „ „ „ + Bact. gracile a	0,0 ¹)	0,34	—	3,14
Hefeauszug IX mit 10 ⁰ / ₁₀₀ neutr. äpfels. Kalium, steril . .	1,07	0,39	0,64	0,56
„ IX „ „ „ „ „ + Bact. gracile a	0,0 ²)	0,38	—	4,34
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfelsaur. Ammon., steril . . .	1,34	0,0 ³)	—	0,44
„ III „ „ „ „ „ + Bact. gracile a	0,0 ⁴)	0,0 ⁴)	—	1,44
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ saur. äpfels. Calcium, steril . .	3,55	0,23	3,30	0,66
„ III „ „ „ „ „ + Bact. gracile a	1,07	0,48	0,54	4,60
Hefeauszug V mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Äthyl, steril	1,23	0,27	0,93	0,54
„ V „ „ „ „ „ + Bact. gracile a (1)	1,61	0,76	0,77	2,14
„ V „ „ „ „ „ + Bact. gracile a (2)	1,84	0,81	0,95	2,16

In diesem Versuche ließ das *Bacterium gracile a* seine ausgesprochene Fähigkeit, Äpfelsäure und deren Salze energisch abzubauen, deutlich erkennen. Alle verwendeten Verbindungen erlitten in kurzer Zeit (ca. 5 Wochen) eine weitgehende Umsetzung mit Ausnahme der mit äpfelsaurem Ammonium versehenen Lösung, die das Bacterium rasch alkalisch und damit für sein weiteres Gedeihen unbrauchbar machte. Überall stellte sich gemäß den Umsetzungsvorgängen auch Gasentwicklung (Kohlensäure) ein, und zwar war bei der Lösung mit saurem äpfelsaurem Calcium schon am 3. Tage eine lebhafte Gasentwicklung zu beobachten.

Die Äpfelsäure wurde durch das Bacterium schon während der

¹) Der Hefeauszug mit äpfelsaurem Kalium zeigte nach Einwirkung des *Bacterium gracile* alkalische Beschaffenheit. Es bedurfte zur Neutralisation von 10 ccm 1,5 ccm ¹/₁₀ Normal-Schwefelsäure.

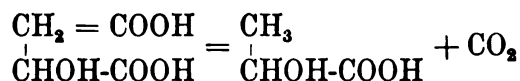
²) Die Kulturflüssigkeit zeigte ebenfalls alkalische Beschaffenheit. 10 ccm bedurften zur Neutralisation 1,6 ccm ¹/₁₀ Normal-Schwefelsäure.

³) Das Destillat des sterilen Hefeauszuges mit äpfelsaurem Ammonium war alkalisch; es bedurfte dasselbe von 50 ccm Kulturflüssigkeit zur Neutralisation 4,2 ccm ¹/₁₀ Normal-Schwefelsäure und

⁴) nach Einwirkung von *Bacterium gracile* das entsprechende Destillat 10,4 ccm ¹/₁₀ Normal-Schwefelsäure.

⁵) Der Hefeauszug mit äpfelsaurem Ammonium war nach Einwirkung des Bacteriums ebenfalls alkalisch; 10 ccm bedurften zur Neutralisation 2,4 ccm ¹/₁₀ Normal-Schwefelsäure.

kurzen Versuchsdauer vollständig abgebaut sowohl, wo nur 2,27 ‰ vorhanden waren als auch bei der ungefähr doppelten Menge von 4,68 ‰, denn bei weiterem Belassen der Kulturflüssigkeiten veränderten sie ihre Zusammensetzung nicht mehr. Neugebildet wurden im ersten Falle 2,02 g — 0,54 g = 1,48 g Milchsäure. Nach der Formel



ergeben 134 g Äpfelsäure 90 g Milchsäure. Demgemäß entsprechen den neugebildeten 1,48 g Milchsäure 2,20 g abgebaute Äpfelsäure. Diese Zahl spricht genügend für den vollständigen Zerfall der 2,27 g anfänglich vorhandenen Äpfelsäure; die flüchtige Säure haben wir absichtlich nicht abgezogen, weil sie erst bei der Destillation frei wurde. Der Hefeauszug reagierte vor dem Säurezusatz neutral. Die nach der Einwirkung des Bacteriums noch vorhandene Gesamtsäure 1,47 g ist also nicht Äpfelsäure, sondern Milchsäure, abzüglich der neu gebildeten flüchtigen Säure von 0,19 = 0,21 g (als Äpfelsäure berechnet). Rechnen wir diese Gesamtsäure 1,47 — 0,21 = 1,26 g in Milchsäure um, so erhalten wir 1,70 g Milchsäure. Bei der Milchsäurebestimmung kamen aber noch die anfänglich vorhandenen 0,54 g hinzu und so erhielt man nach der Rechnung 1,70 + 0,54 = 2,24 g Milchsäure statt der gefundenen 2,02 g. Vergleichen wir die Menge der abgebauten Äpfelsäure 2,27 g mit der der neu entstandenen Milchsäure, so kommen auf 100 g Äpfelsäure 65 g Milchsäure, anstatt der aus der Formel berechneten 67 g. Aus diesen Darlegungen geht zugleich hervor, daß sich die neu gebildete Milchsäure nicht in gebundenem, sondern in freiem Zustande befindet.

Auch beim zweiten Versuch mit einem Zusatz von 4,68 ‰ Äpfelsäure wurde diese vollständig zerlegt, denn der neugebildeten Menge von Milchsäure von 3,60 — 0,54 g = 3,06 g entsprechen nach der Formel 4,55 Äpfelsäure. Auch hier sind nach der Bestimmung aus 100 g Äpfelsäure 65 g Milchsäure entstanden statt 67. Es kann dies nicht überraschen, wenn man berücksichtigt, daß die Bakterien etwas Äpfelsäure auch als Baustoff benutzen werden.

Die beiden Versuche mit neutralem äpfelsaurem Kalium lassen ebenfalls einen kräftigen Abbau der Äpfelsäure in diesem Salze deutlich erkennen. Dabei wird das Kalium frei und die entstehende Milchsäure verbindet sich mit den frei werdenden Kaliumionen. Die Milchsäure findet sich also, trotz der erheblichen Menge, in gebundener Form und kann nichts zur Säuerung der Flüssigkeit beitragen. Bei der Zersetzung des neutralen äpfelsauren Kaliums wird aber von den frei werdenden Kaliumionen nur eines durch die Milchsäure gebunden, und so ist denn begreiflich, daß die Nährflüssigkeit zunächst neutral und schließlich alkalisch wird (vergl. Bemerkung 1 und 2 unter Tabelle 26).

Auch das äpfelsaure Ammonium wurde durch das Bacterium zum Teil abgebaut, wie aus der Zunahme an Milchsäure zu ersehen ist. Doch konnte hier der Vorgang offenbar nicht zu Ende geführt werden, wahrscheinlich des frei werdenden Ammoniaks wegen. Wohl wurde dieses zum Teil gebunden und zwar durch die Milchsäure, allein ein anderer Teil blieb frei, wie die alkalische Reaktion der Versuchsflüssigkeit erkennen ließ (vergl. Bemerkung 5 unter Tabelle 26).

Sehr lebhaft wurde das saure äpfelsaure Calcium angegriffen, denn schon am 3. Tage zeigte sich eine starke Kohlensäureentwicklung,

die zeitweise sogar mit einem Schäumen verbunden war. Auch die große Menge neu entstandener Milchsäure weist darauf hin, daß die Äpfelsäure in diesem Salz leicht und vollständig abgebaut wird. Die Milchsäure wurde wieder gebunden an das bei der Zersetzung des sauren äpfelsauren Calciums frei werdende Calcium; so hätte schließlich die Nährflüssigkeit neutral werden sollen. Allein es ist ja auch etwas flüchtige Säure gebildet worden, und außerdem hat man dem Hefeauszug vor der Zugabe des Salzes ca. 1 ‰ freie Äpfelsäure zugesetzt, die dann ebenfalls in freie Milchsäure abgebaut wurde. Es mußte deshalb ein Teil der Milchsäure frei bleiben, womit auch die schließlich saure Reaktion der Nährflüssigkeit zusammenhängt.

Beim äpfelsauren Äthyl fand die Umsetzung nicht vollständig statt, was aus der Milchsäurebildung geschlossen werden kann. Doch ist die Äpfelsäure ziemlich stark abgebaut worden. Die daraus entstandene Milchsäure findet sich im freien Zustande. Die Menge an Gesamtsäure ist aber etwas größer als der vorhandenen Milchsäure entsprechen würde; der Unterschied wird durch die gebildete flüchtige Säure ausgeglichen. Von allen Substanzen wurde beim äpfelsauren Äthyl am meisten flüchtige Säure gebildet. Bei den übrigen hat das *Bacterium gracile* a seine wertvolle Eigenschaft, die Äpfelsäure abzubauen ohne nennenswerte Mengen von flüchtiger Säure zu bilden, durchwegs gezeigt.

Das *Bacterium gracile* vermag die Äpfelsäure rasch und vollständig abzubauen unter Bildung von Milchsäure und Kohlensäure und nur Spuren von flüchtiger Säure. Es übertrifft in dieser Beziehung das *Bacterium mannitopœum*, indem es energischer wirkt. Auch aus den verschiedenen äpfelsauren Salzen kann es die Äpfelsäure trennen und abbauen und zwar ebenfalls energischer als das *Bacterium mannitopœum*, wie z. B. beim sauren äpfelsauren Calcium und äpfelsauren Äthyl und besonders beim äpfelsauren Ammonium, und neutralen äpfelsauren Kalium, welch letztere zwei Verbindungen *Bacterium mannitopœum* gar nicht anzugreifen vermag. Bei den Salzen des Kaliums, Ammoniums und Calciums wurde die beim Abbau der Äpfelsäure entstehende Milchsäure an die freiwerdenden Basen gebunden.

7. Verhalten des *Bacterium gracile* a gegenüber Weinsäure und weinsauren Salzen.

Zur Prüfung dieses Verhaltens wurden die gleichen Hefeauszüge benützt wie bei den Versuchen mit dem *Bacterium mannitopœum* (p. 179). Es kamen auch die nämlichen Substanzmengen zur Verwendung wie 2,32 und 5,02 ‰ Weinsäure, 10 ‰ und 15 ‰ saures weinsaures Kalium, 10 ‰ neutrales weinsaures Kalium und 10 ‰ neutrales weinsaures Ammonium. Die übrigen Versuchsbedingungen (Temperatur, Versuchsdauer usw.) waren dieselben. Da auch bei *Bacterium gracile* a wie beim *Bacterium mannitopœum* weder die freie Säure noch die Salze angegriffen wurden, so verzichten wir darauf, die analytischen Belege hier anzuführen.

In Anbetracht seiner ausgeprägten Fähigkeit, Äpfelsäure und deren Salze abzubauen, erschien es uns etwas auffallend, daß das *Bacterium gra-*

cile die Weinsäure und ihre Verbindungen gar nicht anzugreifen vermochte, um so mehr noch, als L a b o r d e (3) von zwei aus umgeschlagenen Weinen gezüchteten Mannitbakterien angibt, daß sie in Versuchsweinen 1 g resp. 0,86 g Weinstein pro Liter zum Verschwinden gebracht hätten. Auch von anderer Seite wird, wie bereits angeführt (p.138), das Verschwinden des Weinsteines beim Umschlagen der Weine, wenn auch nicht bei Reinkulturen, erwähnt. Wenn bei unseren Versuchen die Bakterien weder Weinsäure noch ihre Salze angegriffen haben, so könnte man vermuten, sie hätten hier aus Mangel an geeigneter Nahrung nicht zu wachsen vermögen und sie verhielten sich deshalb in einem Wein, wo ihnen außerdem z. B. Äpfelsäure und äpfelsaure Salze geboten sind, anders.

Um diese Frage zur Entscheidung zu bringen, stellten wir noch einen Versuch an, bei welchem dem mit 1 ‰ Äpfelsäure angesäuerten Hefeauszug 15 ‰ Weinstein oder aber 10 ‰ neutrales äpfelsaures Kalium oder endlich 15 ‰ Weinstein und 10 ‰ äpfelsaures Kalium zugesetzt wurden. Zu diesen Lösungen brachte man dann die zu prüfenden Bakterien. Es mögen an dieser Stelle die mit *Bacterium mannitopæum f* und *Bacterium gracile a* erzielten Ergebnisse mitgeteilt werden. Die mit Gärverschlüssen versehenen Versuchsflaschen verweilten während 5 Wochen bei 23°. Schon bei Beginn des Versuches schied sich ein Teil des Weinsteines in Form von Kristallen aus.

Tabelle 27.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug IX mit 15 ‰ Weinstein, steril	3,22	0,39	2,79	0,56
„ IX „ „ „ + Bact. mannit. f	2,81	0,50	2,26	0,56
„ IX „ „ „ + Bact. gracile a	2,34	0,62	1,66	1,12
Hefeauszug IX mit 10 ‰ neutr. äpfels. Kalium, steril	1,07	0,39	0,64	0,56
„ IX „ „ „ „ + Bact. mannit. f	1,14	0,30	0,81	0,45
„ IX „ „ „ „ + Bact. gracile a	0,0 ¹⁾	0,38	—	4,34
Hefeauszug IX mit 10 ‰ neutr. äpfels. Kalium + 15 ‰ Weinstein, steril	3,18	0,39	2,75	0,56
Hefeauszug IX mit 10 ‰ neutr. äpfels. Kalium + 15 ‰ Weinstein, + Bact. mannit. f	3,22	0,38	2,80	1,12
Hefeauszug IX mit 10 ‰ neutr. äpfels. Kalium + 15 ‰ Weinstein, + Bact. gracile a	1,14	0,49	0,60	4,60

In keiner der Lösungen vermochte das *Bacterium mannitopæum f* eine nachweisbare Zersetzung zu verursachen, wohl aber war dies der Fall beim *Bacterium gracile a*. Da, wo dem Hefeauszug nur Weinstein (saures Kaliumtartrat) zugesetzt worden war, zeigte sich eine, wenn auch geringe Zunahme des Milchsäuregehaltes. Man kann dies ohne weiteres der dem Hefeauszug von Anfang an zugesetzten Äpfelsäure (1 ‰) zuschreiben. In der Lösung mit äpfelsaurem Kalium wurde, wie dies zu er-

¹⁾ Der Hefeauszug reagierte alkalisch; die Neutralisation von 10 ccm desselben erforderte 1,6 ccm $\frac{1}{10}$ Normal-Schwefelsäure.

warten war, die Äpfelsäure vollständig umgesetzt unter Bildung von Milchsäure und Kohlensäure und in gleichem Maße auch in der Lösung mit äpfelsaurem Kalium + Weinstein. Offenbar ist aber auch hier die Weinsäure nicht angegriffen worden, obgleich die Äpfelsäure eine kräftige Bakterienentwicklung ermöglichte. Infolge des Abbaues der Äpfelsäure wird das Kalium des äpfelsauren Salzes frei und nur die Hälfte davon wird dann von der Milchsäure gebunden, die andere Hälfte neutralisiert die Nährlösung und macht sie schließlich alkalisch. Da, wo neben dem äpfelsauren Kalium noch Weinstein sich befindet, wird das frei werdende und nicht von der Milchsäure gebundene Kalium zu einem Teil sich nun mit dem Weinstein zu neutralem weinsauren Kalium verbinden. Das saure schwerlösliche Salz (Weinstein) wird in das leichtlösliche neutrale weinsaure Kalium übergeführt. Es muß also bei diesem Vorgang ein teilweises Verschwinden des Weinsteins stattfinden. Bei unserem Versuche konnte durch mikroskopische Beobachtung der Weinsteinkristalle dieser Vorgang allerdings nicht festgestellt werden. Wir neigen im übrigen zu der Ansicht, daß das von einigen Autoren angegebene massenhafte Verschwinden der Weinsteinkrusten der Fässer nicht auf die eben erwähnten Vorgänge zurückgeführt werden kann.

8. *Bacterium gracile a* in Lösungen von Bernsteinsäure, Zitronensäure und Milchsäure.

Aus den gleichen Gründen wie bei dem *Bacterium mannitopœum* (p. 10) wurde auch das Verhalten des *Bacterium gracile a* gegenüber Bernsteinsäure, Zitronensäure und Milchsäure geprüft. Auch hier wurde ein Hefeauszug benutzt, den man vorher nicht mit Äpfelsäure angesäuert hatte. Im übrigen war die Versuchsanstellung die gleiche wie bei den oben erwähnten Versuchen mit *Bacterium mannitopœum*.

Tabelle 28.

					Gesamtsäure als Zitronensäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug	VIII	mit 2,45 ⁰ / ₁₀₀	Zitronensäure, steril		2,45	0,43	0,54
"	VIII	" "	" + Bact. gracile a (1)		1,47	1,19	1,12
"	VIII	" "	" + Bact. gracile a (2)		1,43	1,12	1,12
Hefeauszug	VIII	mit 5,25 ⁰ / ₁₀₀	Zitronensäure, steril		5,25	0,43	0,54
"	VIII	" "	" + Bact. gracile a (1)		2,45	1,98	1,34
"	VIII	" "	" + Bact. gracile a (2)		2,52	1,96	0,90

Auch das *Bacterium gracile a* vermochte ebenso wenig wie *Bacterium mannitopœum* Bernsteinsäure und Milchsäure anzugreifen und wir verzichten daher auf die Wiedergabe der Einzelresultate. Dagegen war das Verhalten des Bacteriums gegenüber der Zitronensäure ein abweichendes. Allerdings vermochte auch das *Bacterium mannitopœum* die Zitronensäure etwas zu zersetzen, allein das *Bacterium gracile a* erwies sich darin doch weitaus energischer. In der säureärmeren Lösung hat es die Umsetzung weiter durchgeführt und auch in der an Zitronensäure reicheren Lösung, wo das *Bacterium mannitopœum*

p. œum gar nicht zu wachsen vermochte, wirkte es stark abbauend. Die Umsetzung der Zitronensäure findet auch hier in anderer Weise statt als die der Äpfelsäure, indem verhältnismäßig wenig Milchsäure und dafür viel flüchtige Säure erzeugt wird. Schon nach 5 Wochen Versuchsdauer (1) waren die 2,45 ‰ Zitronensäure vergoren, was aus der Menge gebildeter flüchtiger Säure und der Milchsäure geschlossen werden kann. Bei der 2. Untersuchung (2), die 6 Wochen später vorgenommen wurde, ergab sich deshalb keine weitere Veränderung der Versuchsflüssigkeit mehr. Auch da, wo 5,25 ‰ Zitronensäure vorhanden waren, erschien der Abbau derselben nach 5 Wochen abgeschlossen; denn auch hier veränderte sich bei weiterer Beobachtung nach 6 Wochen (2) die Versuchsflüssigkeit nicht mehr.

Schon auf p. 181 haben wir erwähnt, daß das von Seifert in Johannisbeerwein beobachtete Zitronensäure vergärende Bacterium mit unserem *Bacterium mannitolpœum* eine gewisse Übereinstimmung zeigt. Ein Unterschied besteht allerdings darin, daß letzteres nur in säurearmen Flüssigkeiten gedeiht und nur geringe Mengen Zitronensäure umsetzt. In dieser Beziehung würde unser *Bacterium gracile* mit dem von Seifert erwähnten Organismus besser übereinstimmen; allein nach den Angaben Seiferts namentlich über die Größenverhältnisse, ist es ganz ausgeschlossen, daß er das *Bacterium gracile* vor sich hatte. Man wird aber annehmen dürfen, daß auch das *Bacterium gracile* in Johannisbeerweinen vorkommt und dann Zitronensäure zersetzt.

Von den 3 Säuren werden durch das *Bacterium gracile* die Bernsteinsäure und die Milchsäure nicht angegriffen; dagegen wird die Zitronensäure in energischer Weise unter Bildung von wenig Milchsäure, von Kohlensäure und viel flüchtiger Säure vergoren.

9. Verhalten des *Bacterium gracile* a gegenüber verschiedenen Alkohol- und Säuregehalten.

Um das Verhalten des *Bacterium gracile* gegenüber verschiedenen Alkoholmengen zu prüfen, wurde dem Hefeauszug zur Ansäuerung etwas Weinsäure und, um das Bakterienwachstum zu fördern, 19,2 ‰ Dextrose (als Invertzucker berechnet) zugefügt. Der Alkoholzusatz erfolgte in Form eines chemisch reinen 99-proz. Alkohols. Die Versuchsflüssigkeiten waren genau dieselben wie bei den diesbezüglichen Versuchen mit *Bacterium mannitolpœum* und ebenso die Gärtemperatur (23°) und Versuchsdauer (60 Tage).

Tabelle 29.

		Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug	X ohne Alkohol, steril	1,00	0,37	0,59	0,54
"	X " " + Bact. gracile a	6,66	1,69	4,80	4,86
"	X + 3,75 Gew. % Alkohol + Bact. gracile a	5,69	1,56	3,97	4,36
"	X + 7,66 " " " + Bact. gracile a	1,04	0,53	0,46	0,78
"	X + 11,69 " " " + Bact. gracile a	0,94	0,36	0,54	0,32
"	X + 15,65 " " " + Bact. gracile a	0,87	—	—	—

In allen diesen Versuchsflüssigkeiten wirkte *Bacterium gracile* weniger energisch ein als wir beim *Bacterium mannitolpœum* beobachteten. Außerdem zeigte das *Bacterium gracile* auch eine größere Empfindlichkeit gegen Alkohol, indem bei 7,66 Gewichts-Proz. (=9,66 Vol.-Proz.) fast keine Umsetzung mehr stattfand, während *Bacterium mannitolpœum* bei diesem Alkoholgehalt noch eine recht ausgiebige Milchsäurebildung aufwies. Die beobachtete Zunahme an Gesamtsäure ist auf die uns nun bekannte Vergärung von Dextrose unter Milchsäure- und Essigsäurebildung zurückzuführen. Wir können wohl annehmen, daß beim *Bacterium gracile* die Grenze der Entwicklungsfähigkeit gerade bei 9,66 Vol.-Proz. Alkohol liegt, bei *Bacterium mannitolpœum* nach unserer Schätzung bei ca. 12 Vol.-Proz.

Für die Versuche über die Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Äpfelsäure verwendete man einen Hefeauszug, der nicht vorgängig mit Äpfelsäure angesäuert wurde und einen Zusatz von ca. 10 ‰ Dextrose erhielt. Die angewendeten verschiedenen Äpfelsäuremengen sind aus nachfolgender, die Versuchsergebnisse enthaltenden Tabelle 30 zu ersehen. Temperatur = 23°, Versuchsdauer ca. 7 Wochen.

Tabelle 30.

		Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug XI	+ 3,15‰ Äpfelsäure, steril	3,15	0,35	2,77	0,54
" XI	" + Bact. gracile a.	5,22	2,14	2,87	4,82
Hefeauszug XI	+ 6,56‰ Äpfelsäure, steril	6,56	0,35	6,17	0,54
" XI	" + Bact. gracile a.	5,63	1,96	3,47	5,26
Hefeauszug XI	+ 9,65‰ Äpfelsäure, steril	9,65	0,35	9,26	0,54
" XI	" + Bact. gracile a.	4,95	0,72	4,16	5,62
Hefeauszug XI	+ 12,46‰ Äpfelsäure, steril	12,46	0,35	12,07	0,54
" XI	" + Bact. gracile a.	8,10	0,94	7,07	4,50
Hefeauszug XI	+ 15,54‰ Äpfelsäure, steril	15,54	0,35	15,15	0,54
" XI	" + Bact. gracile a.	15,27	0,38	14,85	0,72

Schon nach 4 Tagen zeigte die Versuchsflüssigkeit mit 3,15 ‰ Äpfelsäure eine deutliche Trübung und Gasentwicklung. Erst am 14. Tage war dies auch bei 6,56 ‰ Äpfelsäure bemerkbar und noch später fand die Entwicklung bei den säurereichen Flüssigkeiten statt. Am Schluß des Versuches konnten wir aber selbst bei 12,46 ‰ Äpfelsäure eine starke Entwicklung und einen weitgehenden Säureabbau feststellen. Nach dem Milchsäuregehalt zu schließen, muß sogar noch bei 15,54 ‰ Äpfelsäure eine schwache Bakterieneinwirkung stattgefunden haben. Doch wäre dieser Säuregrad als die obere Grenze zu betrachten. In diesem Versuch hat das *Bacterium gracile* wiederum seine eminente Eigenschaft, Äpfelsäure abzubauen, erwiesen, sowie seine Fähigkeit, auch bei hohem Gehalt an dieser Säure noch zu gedeihen. *Bacterium mannitolpœum* (Tabelle 12, p. 184) vermochte in den gleichen Flüssigkeiten und unter gleichen Verhältnissen lange nicht so weitgehende Umsetzungen hervorzurufen und ließ schon

bei 9,65 ‰ Äpfelsäure, wo das *Bacterium gracile* am meisten Milchsäure erzeugte, eine deutliche Hemmung erkennen, während bei 12,46 ‰ Äpfelsäure gar keine Entwicklung mehr stattfand.

Interessant ist ein Vergleich der Gärprodukte bei den verschiedenen anfänglichen Säuregehalten, wobei zu berücksichtigen ist, daß sowohl Dextrose als Äpfelsäure vorhanden waren und beide nach unseren Feststellungen durch das *Bacterium gracile* vergoren werden können, und zwar die Zuckerart unter Bildung von viel flüchtiger Säure und Milchsäure, die Äpfelsäure unter Entstehung von viel Milchsäure und wenig flüchtiger Säure. Wie die große Menge von flüchtiger Säure in der Flüssigkeit mit 3,15 ‰ Äpfelsäure beweist, wurde hier Dextrose umgesetzt, was übrigens auch aus dem hohen Gehalt an Milchsäure hervorgeht, der den an ursprünglicher Säure übertrifft. Rechnet man die neugebildete Milchsäure $4,82 - 0,54 = 4,28$ in Äpfelsäure um, so gibt dies 3,18 g Äpfelsäure. Von 2,14 g flüchtiger Säure sind 0,35 g anfänglich vorhanden und zwar nicht sauer reagierend, in Form von Estern. Bei der Gesamtsäure (5,22) kommen 2,14—0,35 flüchtige Säure = 1,79 (als Essigsäure) = 1,99 (als Äpfelsäure berechnet) in Abzug und es bleiben somit 3,23 g nichtflüchtige Säure als Äpfelsäure. In Form von Milchsäure findet sich davon, wie erwähnt, = 3,18 g also die Gesamtheit. Es ist demnach alle Äpfelsäure durch das *Bacterium* abgebaut worden und daneben noch eine ziemliche Menge Dextrose, genügend um ca. 2,2 g Milchsäure zu liefern, denn aus der abgebauten Äpfelsäure kann nach der Formel nur 2,1 g Milchsäure entstehen.

Treten wir z. B. noch näher ein auf die Umsetzungen bei anfänglich 9,65 ‰ Äpfelsäure, so fällt zunächst auf, daß trotz sehr ausgiebiger Milchsäurebildung nur sehr wenig flüchtige Säure entstanden ist. Auch hier läßt sich durch Berechnung feststellen, wie weit die Äpfelsäure abgebaut wurde. Von der Milchsäure kommt bei der Titrierung der Versuchsflüssigkeit nur die neugebildete zum Ausdruck; rechnen wir sie in Äpfelsäure um, so gibt dies 3,7 g Äpfelsäure. Nun beträgt aber die noch vorhandene nicht flüchtige Säure $4,95 \text{ g} - 0,41 \text{ g}$ neugebildete flüchtige Säure (als Äpfelsäure) = 4,54 g Äpfelsäure. Neben der Milchsäure muß demnach noch eine andere nichtflüchtige Säure sich vorfinden und das kann nur Äpfelsäure sein. Es ist also nicht alle Äpfelsäure, aber doch mehr als 90 Proz. derselben abgebaut worden. Da diese Menge ausreicht, um die neugebildete Milchsäure zu liefern, so kann daraus geschlossen werden, daß Dextrose in diesem Falle nicht angegriffen wurde, womit dann auch die geringe Bildung von flüchtiger Säure übereinstimmt. Es ist sehr bemerkenswert, daß dieses *Bacterium* bei Gegenwart von Äpfelsäure und Dextrose die Äpfelsäure zuerst abbaut.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei dem Hefeauszug mit anfänglich 12,46 ‰ Äpfelsäure; nur ist hier der Abbau der Äpfelsäure nicht so weit gediehen.

Die hier beobachteten Eigenschaften des *Bacterium gracile* lassen dasselbe als sehr geeignet für den Säureabbau in Obst- und Traubenweinen erscheinen, umsomehr als es befähigt ist, selbst bei hohen Säuregehalten noch zu wachsen und lebhaft zu wirken. Eines der hierher gehörigen Bakterien, *Bacterium gracile* w wurde auch aus einem säurereichen, dann einen starken Säureabbau zeigenden Apfelwein gezüchtet.

Zusammengefaßt hat sich ergeben, daß das *Bacterium gracile* a in äpfelsäurehaltigen Nährflüssigkeiten die

Äpfelsäure energisch abbaut und daß es hohe Konzentrationen dieser Säure bis 15 ‰ zu ertragen vermag.

10. Einfluß der Temperatur auf die Gärfähigkeit von *Bacterium gracile* a.

Wie beim *Bacterium mannitolæum*, so wurde auch hier Saft von der „Schweizer Wasserbirne“ verwendet, den man in 300 ccm Flaschen abfüllte, sterilisierte und mit dem *Bacterium gracile* a impfte. Die mit Gärverschlüssen versehenen Flaschen kamen in den Panumschen Thermostaten zu stehen. Versuchsdauer und Temperatur waren dieselben wie beim Versuch mit *Bacterium mannitolæum* (p. 185). Zusammensetzung des Obstsaftes: 2,27 ‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure); 0,19 ‰ flüchtige Säure (als Essigsäure); 0,56 ‰ Milchsäure.

Tabelle 31.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l			Flüchtige Säure als Essigsäure g im l			Milchsäure g im l		
	nach 10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen	10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen	10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen
bei 6,5°	2,27	2,01	1,47	0,11	0,16	0,31	0,44	0,56	1,34
9,8°	2,27	1,74	2,04	0,12	0,17	1,38	0,44	1,01	3,70
14,0°	1,47	0,93	2,21	0,24	0,61	1,32	1,50	2,81	3,92
18,5°	0,73	1,14	1,54	0,36	0,81	1,12	2,34	3,24	3,70
22,5°	0,80	1,40	1,47	0,42	0,96	1,06	2,84	3,36	3,46
26,5°	0,67	1,54	2,61	0,41	0,93	1,62	2,62	3,46	4,04
34,5°	1,21	0,67	0,80	0,34	0,40	0,66	1,56	2,24	3,02

Ogleich das *Bacterium gracile* in erster Linie die Äpfelsäure abbaut und dadurch eine Säureabnahme verursacht, kann doch nicht der Gehalt an Gesamtsäure des Obstweines als Maßstab für die Bakterientätigkeit benutzt werden, weil die anfängliche Säureabnahme durch eine spätere Säurezunahme teilweise verdeckt wird; eher eignet sich hierfür die Menge der neugebildeten Milchsäure. Benutzt man zum Vergleich die nach 10 Tagen gefundenen Werte, so würde zwischen 22,5 und 26,5° und zwar näher an letzterer Temperatur, vielleicht bei 25°, die kräftigste Wirkung stattgefunden haben. Bezeichnet man diese als Säuerung, so kommt bei *Bacterium gracile* die größte Säuregeschwindigkeit zwischen 22,5° und 26,5° zu liegen, während bei *Bacterium mannitolæum* dieselbe, nach dem Verhalten der Gesamtsäure beurteilt, zwischen 26,5 und 34,5° liegt. Im weiteren Verlauf des Versuches hat denn auch beim *Bacterium gracile* bei den höheren Temperaturen die Milchsäure nur noch langsam zugenommen, mehr dagegen bei den niederen Wärmegraden, so z. B. bei 22,5° vom 10. bis zum 23. Tage noch um 0,52 ‰, vom 23. bis zum 79. Tag noch um 0,10 ‰, bei 18° dagegen um 0,90 ‰ resp. 0,46 ‰ und bei 14° um 1,31 ‰ resp. 1,11 ‰. Am Ende des Versuches zeigte der Milchsäuregehalt in den Flaschen bei 14—26,5° keine großen Verschiedenheiten. Der höchste Säuregrad (4,04 ‰ Milchsäure) wurde bei 26,5° erreicht. Selbst bei den niederen Temperaturen von 6,5° hat übrigens noch ein ziemlich rascher Säureabbau stattgefunden. Die Gesamtsäure sank von 2,27 auf 1,47 ‰ bei einer Produktion von 0,78 ‰ Milchsäure. Das macht erklärlich, daß selbst

Die größte Umsetzung (größte Säuerungsgeschwindigkeit) fand zwischen 22°—26,5° statt; 34,5° bildete noch nicht die obere Grenze der Bakterientätigkeit. Im Verlauf von 23 Tagen wurden die größten Gehalte an Milchsäure bei 18,5—26,5° erzielt.

Zu gleicher Zeit und im gleichen Hefeauszug, in dem der diesbezügliche Versuch mit *Bacterium mannitopæum* ausgeführt wurde, p. 187) stellten wir auch einen solchen mit *Bacterium gracile* an. Über das Nähere betreffend die Versuchsanstellung sei auf jenen Abschnitt verwiesen. Der Versuch dauerte ebenfalls 39 Tage; die Versuchsfaschen standen im Brutraum bei 19°.

						Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug	X	mit 19,2 ⁰ / ₁₀₀	Dextrose, steril		1,03	0,37	0,62	0,54
"	X	" "	"	+ Bact. gracile a mit Luft	. . .	5,69	1,51	4,03	4,60
"	X	" "	"	+ Bact. gracile a ohne Luft	. . .	5,96	1,43	4,39	5,21

Das Versuchsergebnis läßt deutlich erkennen, daß das *Bacterium gracile* bei Sauerstoffzutritt ebenso zu gedeihen vermag, wie bei Abschluß von freiem Sauerstoff. Einen kleinen Unterschied möchten wir doch hervorheben, weil er auch beim *Bacterium mannitopæum* in gleicher Weise auftrat. In beiden Fällen wurde bei Luftabschluß etwas mehr Milchsäure erzeugt und dafür weniger flüchtige Säure.

Bacterium gracile gehört nach diesem Befunde zu den fakultativen Anaërobiern.

12. *Bacterium gracile* in unvergorenen Obst- und Traubensäften.

Diese Versuche bezweckten einerseits die bei den künstlichen Lösungen durch *Bacterium gracile* erzielten Ergebnisse auch in natürlichen Säften von Obstfrüchten und Trauben nachzuprüfen und andererseits verschiedene hierher gehörige Bakterien, a, g und s, die wir aus Obst- und Traubenweinen reingezüchtet haben, miteinander zu vergleichen. Im wesentlichen benützte man dabei die gleichen Säfte wie bei dem *Bacterium mannitopæum* (p. 188) und wir können uns daher bezüglich der Beschreibung der Versuchsanstellung hier kurz fassen. Bei dem ersten Versuch mit Wasserbirnsaft in 300 ccm Flaschen mit Watteverschluß und bei einer Gärtemperatur von anfänglich 23, später 15° war nach ½ Jahr die Zusammensetzung folgende:

Tabelle 33.

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Wasserbirnsaft, steril	89,97	2,21	0,18	2,02	0,78
„ + <i>Bact. gracile</i> a	87,6	0,80	0,66	0,07	2,08
„ + <i>Bact. gracile</i> g	84,6	1,00	0,61	0,33	2,02
„ + <i>Bact. gracile</i> s	87,3	1,61	0,61	0,94	2,13

Alle 3 Bakterien haben Äpfelsäure abgebaut, am wenigsten *Bacterium gracile* s, während die anderen ungefähr gleich wirkten; bei a und s ist wohl nur wenig Zucker zersetzt worden, während *Bacterium gracile* g noch etwas Zucker abgebaut hat. Warum die Umsetzung bei allen 3 Bakterien nicht weiter ging, obgleich noch viel Zucker vorhanden war und die gebildeten Säuren noch kein Hindernis bilden konnten, vermögen wir nicht zu erklären. Möglicherweise spielt die Beschaffenheit des Flaschenverschlusses hierbei eine Rolle. Bei einem anderen Versuche zeigte der gleiche Wasserbirnsaft in Flaschen mit Gärverschlüssen und dem *Bacterium gracile* i nach 50 Tagen bei 23° folgende Zusammensetzung: 1,67‰ Gesamtsäure (Äpfelsäure); 1,19‰ flüchtige Säure (Essigsäure) und 3,36‰ Milchsäure. Wenn auch das *Bacterium gracile* i ein kräftiges ist, so möchten wir doch die nachgewiesene Abweichung nicht diesem Umstand allein zuschreiben, sondern eher annehmen, daß noch ein anderer Faktor,

wahrscheinlich die Art des Verschlusses, mitgewirkt hat. Wie noch besonders hervorgehoben sei, geht aus diesem Nebenversuch noch deutlicher als aus dem in Tabelle 33 dargestellten hervor, daß durch kräftiger wirkende Vertreter von *Bacterium gracile* in solchen Obstsäften nicht nur die vorhandene Äpfelsäure sondern auch noch eine merkliche Menge Zucker umgesetzt wird.

Bei diesem Nebenversuch, wie beim Hauptversuch muß die gebildete Milchsäure bei der Untersuchung sich in gebundener Form vorgefunden haben, denn die titrierbare nicht flüchtige Säure beträgt beim *Bacterium gracile* a nur 0,07 g, die neugebildete Milchsäure dagegen 1,3 g; unter den übrigen Vertretern von *Bacterium gracile* verhielt sich g ähnlich.

Infolge der Abnahme an nicht flüchtiger Säure trat bei diesen Obstsäften eine Schwarzfärbung ein, besonders deutlich bei *Bacterium gracile* a und g, wo auch die Säure stärker abgebaut worden ist. Dieser bei der Obstweinbereitung hie und da auftretende Fehler macht sich auch bei unseren Versuchen immer dann bemerkbar, wenn ein starker Säureabbau stattfand und die Flaschen geöffnet wurden.

Während bei *Bacterium mannito pœum* im Wasserbirnsaft ein üppiges Wachstum eintritt und dementsprechend ein starkes Depot von mehreren mm bis $\frac{1}{2}$ cm Mächtigkeit auf der ganzen Bodenoberfläche abgesetzt wird, ist dies bei dem *Bacterium gracile* selbst bei günstigem Gedeihen nicht der Fall; die entsprechende Bakterienmasse ist weit geringer. Wohl tritt auch bei diesem Bacterium schon bald eine starke Trübung auf, die immer länger sich erhält als bei *Bacterium mannito pœum*; allein nach dem Verschwinden der Trübung findet sich nur eine geringe Menge Depot, oft nur in Form eines Ringes auf dem Boden der Flaschenwand entlang oder als eine sehr dünne den ganzen Boden bedeckende Schicht. Immerhin unterscheiden sich auch hierin wieder die verschiedenen Vertreter von *Bacterium gracile* a, g, s und i. Von diesen bilden g und i durchwegs ein stärkeres Depot als die beiden anderen. Sie sind aber auch in den meisten Verhältnissen die kräftiger wirkenden.

Bei der mikroskopischen Prüfung fanden sich im Wasserbirnsaft mit *Bacterium gracile* s Kurzstäbchen und daneben zarte geknickte Fäden, bei a und g nur Kurzstäbchen.

Wie sehr das Gedeihen der Bakterien in Obstsäften durch den Gerbstoffgehalt beeinträchtigt werden kann, möge noch folgender Versuch dartun. Zur Verwendung kam ein Marxenbirnsaft vom Jahre 1908 mit nur 2,87 ‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure), der aber außerordentlich herb schmeckte und bei längerem Stehenlassen eine dicke käsig-e Ausscheidung bildete, was ein weiterer Beweis des hohen Gerbstoffgehaltes ist (vgl. Kelhofer 1; p. 398). In diesem Obstsaft, der mit verschiedenen Bakterien geimpft wurde, zeigten nur *Bacterium mannito pœum* f, p, q und t einige Entwicklung, während *Bacterium gracile* a, g und s sich gar nicht vermehrten. Da alle anderen Bedingungen günstig waren, so kann diese Erscheinung nur auf den hemmenden Einfluß des Gerbstoffes zurückgeführt werden, dem *Bacterium gracile* also noch weniger zu widerstehen vermag als *Bacterium mannito pœum*.

Auch in einem entsäuerten Traubensaft (Spätburgunder) wurde mit dem *Bacterium gracile* a ein Versuch durchgeführt. Die Entsäuerung des ca. 13 ‰ Gesamtsäure aufweisenden Saftes fand wie beim Versuch mit *Bacterium mannito pœum* (p. 192) durch reinen

kohlensauen Kalk in verschiedener Weise statt, so daß in einem Falle noch 3,2 ‰, im anderen hingegen nur 1,87 ‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure) enthalten waren. Die 400 ccm Versuchsflaschen waren mit Gärverschlüssen versehen und standen während ca. 22 Wochen bei einer Temperatur von ca. 16°.

Wie das *Bacterium mannitolpœum* f hat auch das *Bacterium gracile* a in diesen entsäuerten Traubensäften starke Umsetzungen verursacht (Tabelle 34). Neben der starken Erhöhung des Gesamtsäuregehaltes fallen die beträchtliche Zunahme an flüchtiger Säure und Milchsäure und sodann die erhebliche Mannitbildung auf. Auch die starke Abnahme des Zuckergehaltes um 42 resp. 44 g pro Liter zeigt, wie intensiv die Bakterien gewirkt haben; immerhin war die Wirkung bei *Bacterium mannitolpœum* noch beträchtlicher. Die beiden Säfte verhielten sich nicht sehr verschieden. Im stark entsäuerten gingen die Umsetzungen noch etwas weiter vor sich als im schwach entsäuerten. Abweichend von anderen Versuchen (mit Obst-säften) war hier die Milchsäure zum größten Teil nicht gebunden. Es ist diese Erscheinung wohl darauf zurückzuführen, daß die Milchsäure nur zu einem geringen Teil durch Abbau von gebundener Äpfelsäure entstand, weil eben die ursprünglich vorhandene Weinsäure ganz und die Äpfelsäure größtenteils durch die große Menge zugesetzten Calciumkarbonats in Form unlöslicher Verbindungen ausgefällt und dann durch Filtration entfernt worden waren. Die aus dem gelöst gebliebenen sauren äpfelsauren Calcium gebildete Milchsäure konnte dann durch das beim Abbau der Säure freiwerdende Calcium wohl gebunden werden, nicht aber die weitaus größere bei der Zersetzung von Zucker entstandene Menge.

Tabelle 34.

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Mannit	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Traubensaft, schwach entsäuert, steril	164,3	3,20	0,04	3,16	0,56	—	206,1
Traubensaft, schwach entsäuert, + <i>Bact. gracile</i> a	122,8	9,65	3,61	5,68	9,54	20,6	191,6
Traubensaft, stark entsäuert, steril	164,3	1,87	0,02	1,85	—	—	—
Traubensaft, stark entsäuert, + <i>Bact.</i> <i>gracile</i> a	120,6	9,85	4,27	5,15	—	29,8	185,3

Auf die durch das *Bacterium gracile* verursachte weitgehende Umsetzung von Zucker wurde bereits hingewiesen. Daß dabei Milchsäure und flüchtige Säure gebildet werden, haben unsere Versuche dargetan, und es bringt also der hohe Gehalt der Versuchsweine an Milchsäure und flüchtiger Säure keine Überraschung. Die große Menge Mannit (20,6 g und 29,8 g pro Liter) weist auf einen starken Abbau von Lävulose hin und zeigt wiederum, daß auch das *Bacterium gracile* die Lävulose rascher angreift als die Dextrose. Dem starken Verbrauch an Zucker entspricht nicht etwa eine starke Abnahme des Extraktgehaltes, was durch die ausgiebige Mannitbildung genügend erklärt wird.

Wie das *Bacterium mannitolpœum*, so baut auch das *Bacterium gracile* in Obst- und Traubensäften sowohl

Äpfelsäure als Zucker ab, die Säure intensiver, den Zucker also weniger energisch als die erstere. Dabei entstehen Kohlensäure, Essigsäure, Milchsäure und Mannit event. Äthylalkohol. Die immer wieder auftretenden Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Vertreter von *Bacterium gracile* deuten darauf hin, daß wir es auch bei diesem *Bacterium* mit verschiedenen Rassen zu tun haben.

13. Gegenseitige Beeinflussung von *Bacterium gracile* und Hefe.

Aus den nämlichen Gründen, aus denen wir die Wirkung des *Bacterium manniopæum* bei Anwesenheit von Weinhefen verfolgt haben (p. 194), suchten wir auch beim *Bacterium gracile* festzustellen, in welcher Weise gärende Hefe und diese Bakterien in einem Obstsaft aufeinander zu wirken vermögen. Man verwendete dazu den gleichen entsäuerten Schellerbirnsaft mit 128,76 g Zucker (als Invertzucker) wie bei dem schon erwähnten Versuche. Versuchsdauer und Temperatur waren dieselben.

Tabelle 35.

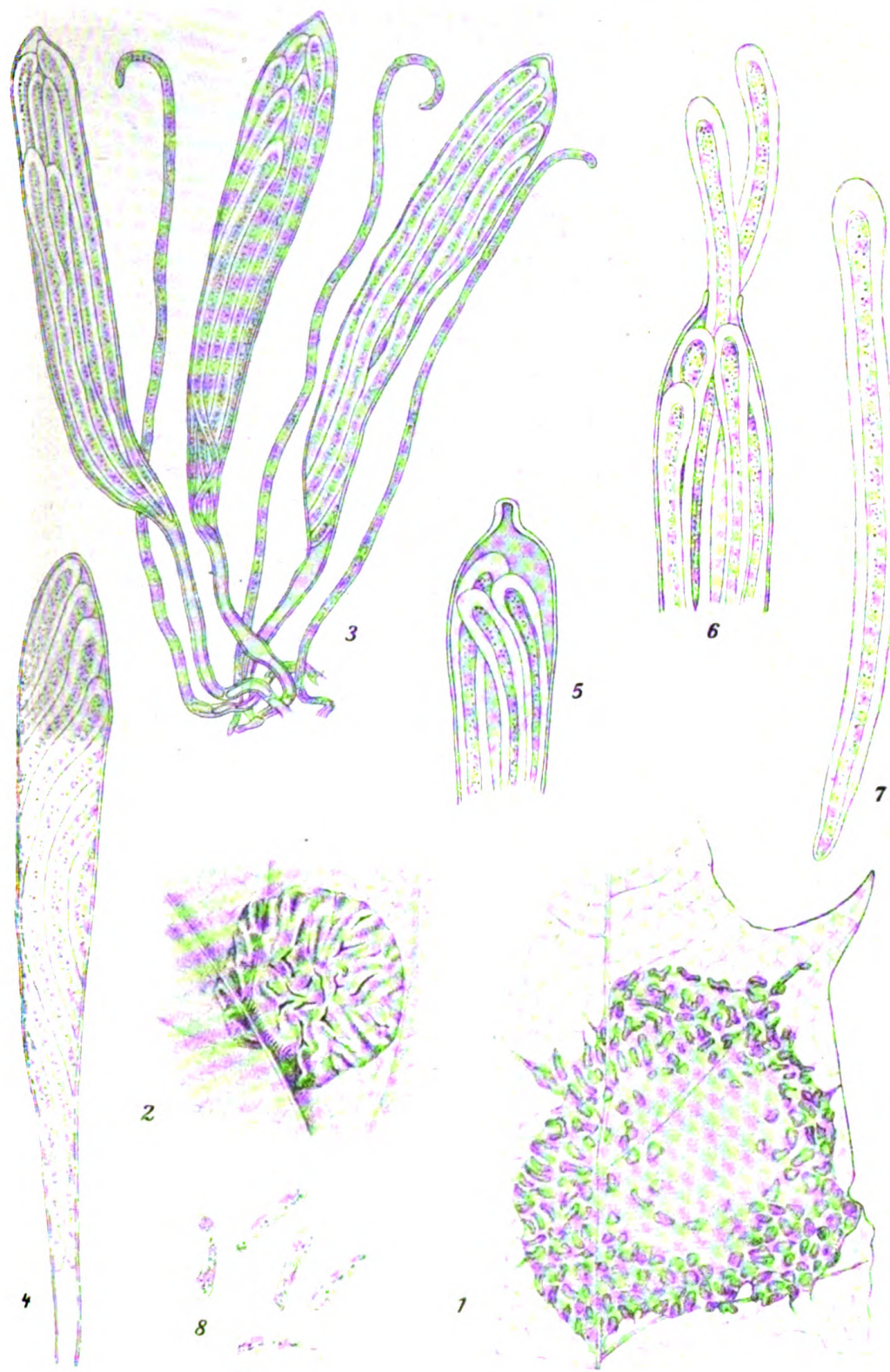
	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Schellerbirnsaft entsäuert, 1906, steril . .	—	2,28	0,12	2,15	—	185,8
„ „ „ + Bact. gracile a	—	2,21	0,14	2,06	—	—
„ „ „ + Bact. gracile a + Hefe	62,5	0,80	0,41	0,35	4,94	—
„ „ „ + Bact. gracile g	—	2,34	0,19	2,13	—	—
„ „ „ + Bact. gracile g + Hefe	62,52	0,74	0,43	0,27	5,16	40,4
„ „ „ + Bact. gracile s	—	2,27	0,14	2,12	—	—
„ „ „ + Bact. gracile s + Hefe	62,10	0,60	0,28	0,29	5,00	40,4

Erst 14 Tage, nachdem die Bakterien dem Obstsaft zugefügt waren, beschickte man einen Teil der Flaschen mit einer reingezüchteten Obstweinhefe. Während dieser Zeit hat aber jedenfalls kein merkbares Wachstum der Bakterien stattgefunden, denn in denjenigen Versuchsgefäßen, wo die Bakterien allein blieben, ließ sich selbst nach ca. 22 Wochen kein Bakterienwachstum konstatieren und ebenso natürlich keine Veränderung der Kulturflüssigkeit, wie aus obiger Tabelle zu ersehen ist. Da, wo nun Hefe zugesetzt wurde, vermochten sich dagegen die Bakterien zu vermehren und Umsetzungen zu verursachen, wahrscheinlich namentlich gegen den Schluß

der Alkoholgärung hin. Die Bakterien waren aber nicht imstande, die Alkoholgärung zu unterbrechen; die gebildete Alkoholmenge spricht für ziemlich vollständige Vergärung des ursprünglich vorhandenen Zuckers. Dagegen hatte die Hefe einen großen Einfluß auf das Gedeihen der Bakterien; in welcher Weise sie diesen begünstigenden Einfluß ausübte, läßt sich aber aus den Versuchen nicht ersehen. Möglicherweise fördern die von der Hefe assimilierten und bei ihrem Absterben frei werdenden Stickstoffverbindungen das Wachstum, zu welcher Ansicht A. Koch und W. Seifert neigen. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß die günstige Einwirkung eine andere ist und durch die Kohlensäureerzeugung der Hefe zustandekommt, worauf unsere Erfahrung mit durch Gärverschlüssen oder nur durch Wattestopfen verschlossenen Versuchsflaschen hinweisen könnte.

In den Weinen mit Hefe und Bakterien fand ein Abbau der Säure statt; die nicht flüchtige Säure ist fast vollständig, bis auf durchschnittlich 0,3 g, verschwunden. Wir dürfen diese Wirkung ohne weiteres den Bakterien zuschreiben. Mit der verhältnismäßig doch geringen Menge der abgebauten Säure (1,85 g) steht die große Milchsäuremenge aber nicht im Einklang, was darauf hindeutet, daß noch weitere Substanzen von den Bakterien zersetzt worden sein müssen. Daß dies aber nicht Zucker war, geht aus der geringen Menge flüchtiger Säure hervor; sowohl Dextrose als Lävulose liefern beim Abbau durch das *Bacterium gracile* neben viel Milchsäure bedeutendere Mengen von flüchtiger Säure (vgl. Tabelle 22, p. 206). Es kann sich in diesem Falle nur um den Abbau einer größeren Äpfelsäuremenge handeln, als sie durch Titration nachgewiesen wurde. Durch die Entsäuerung mittels reinen kohlensauren Calciums ist ohne Zweifel Äpfelsäure gebunden und, da die Flüssigkeit noch sauer reagierte, in saures äpfelsaures Calcium übergeführt worden. Vergleichen wir auf Tabelle 26 (p. 210) die Umsetzung dieses Salzes durch das *Bacterium gracile*, so ergibt sich, daß dort ein ähnlicher Vorgang stattgefunden hat, wie in dem vorliegend entsäuerten Schellerbirnsaft. Wir können für diese Auffassung noch einen weiteren Beweis anführen. Die nachgewiesene beträchtliche Menge Milchsäure fand sich fast vollständig in gebundener Form. Es mußten also durch die Bakteriengärung Ionen frei werden, welche die entstehende Milchsäure neutralisierten und das werden die beim Abbau des äpfelsauren Salzes frei werdenden Calcium-Ionen sein. Die aus der titrierten Gesamtsäure berechnete Menge von saurem äpfelsaurem Calcium würde aber noch nicht hinreichen, die neu gebildete Milchsäure zu liefern. Es muß daher angenommen werden, daß auch noch ein neutrales äpfelsaures Salz umgesetzt wurde, vielleicht, da neutrales äpfelsaures Calcium fast unlöslich ist, neutrales äpfelsaures Kalium. Ein großer Unterschied zwischen den 3 Rassen trat nicht hervor; auch hier zeigte sich das *Bacterium gracile* etwas kräftiger als die beiden anderen.

Während die Rassen von *Bacterium gracile* meist einen schnellen Zerfall der sich teilenden Bakterien in einzelne Kurzstäbchen zeigen und so gewöhnlich ein zartes gleichmäßig beschaffenes schlammiges Depot bilden, verhielten sie sich in diesem Schellerbirnsaft etwas anders. Die Bakterien blieben beim Wachstum zusammenhängend und bildeten lange, ineinander verschlungene, fein „geknitterte“ Fäden (Taf. I, Fig. 5), so daß makroskopisch deutlich abgegrenzte kleinere Flocken zu beobachten waren, teils an den Flaschenwänden, teils dem Hefetrub aufsitzend. Hierin zeigten sie eine gewisse Ähnlichkeit mit dem *Bacterium mannito-*



K. Müller n. d. Nat. gez.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

pœum. Nur sind die Fäden beim *Bacterium gracile* beträchtlich dünner und regelmäßig kurz gegliedert, so daß die Bakterienfäden streptokokkenartig aussehen.

In gleicher Weise und zu derselben Zeit wie mit dem Schellerbirnsaft wurde auch ein Versuch mit einem säurearmen Reinholzbirnsaft durchgeführt. Dieser daher, um das Bakterienwachstum zu ermöglichen, nicht entsäuert werden und unterscheidet sich also in dieser Beziehung von dem vorhergehenden. Offenbar eignete sich dieser Saft besser für die Bakterien, denn diese wuchsen auch ohne Anwesenheit von Hefe und entwickelten sich da, wo man die Hefe 14 Tage später zusetzte, schon vor dem Zusatz derselben. Dementsprechend war hier eine Einwirkung der Umsetzungsprodukte auf das Hefewachstum möglich; es trat auch eine solche ein. Der ursprüngliche Zuckergehalt des Saftes (125,08 g im Liter) hätte bei vollständiger Vergärung etwa 60 g Alkohol liefern sollen. Nun sind aber beim Zusammenwirken von *Bacterium gracile* a und s mit Hefe nur 43 bzw. 44,5 g und bei *Bacterium g* mit Hefe sogar nur 20,8 g innert 5 Monaten entstanden. Die nachgewiesenen Umsetzungsprodukte, flüchtige Säure und Milchsäure, waren aber in den bestimmten Mengen (s. nachfolgende Tabelle 36) offenbar nicht imstande, einen so stark hemmenden Einfluß auf die Gärtätigkeit der Hefen auszuüben, auch wenn sie schon vor dem Hefezusatz vorhanden gewesen wären, welches letzteres aber nicht anzunehmen ist. Es müssen also andere Stoffe diese Wirkung ausgeübt haben, und wir können nur an spezifische Umsetzungsprodukte des *Bacterium gracile* oder *Bacterium mannitopœum*, wo ja ähnliches beobachtet wurde, denken. Daß diese Gärungshemmung nicht etwa in der ursprünglichen Beschaffenheit des Obstsaftes lag, beweist der in der Folge mitzuteilende Versuch mit der *Micrococcus*-Gruppe, wo trotz ähnlicher Mengen flüchtiger Säure und Milchsäure eine vollständige Vergärung durch die Hefe stattfand.

Eine eigenartige Einwirkung auf die Hefe ließ auch der mikroskopische Befund des Trubs erkennen, indem gerade da, wo eine Gärungshemmung durch das *Bacterium gracile* und *Bacterium mannitopœum* stattfand, eigenartig beschaffene, große Vakuolen enthaltende, sogenannte Riesenzellen der Hefe häufig vorkamen. Dies war aber nicht der Fall, wo im gleichen Saft neben Hefe *Micrococcus*-Arten sich fanden.

Tabelle 36.

	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Reinholzbirnsaft 1907, steril	—	2,68	0,34	2,31	—	169,5
„ „ + Bact. gracile a	—	1,20	0,84	0,28	1,80	167,0
„ „ + Bact. grac. a + Hefe	43,0	2,48	0,71	1,70	2,80	74,6
„ „ + Bact. gracile g	—	1,27	0,82	0,37	1,90	166,7
„ „ + Bact. grac. g + Hefe	20,8	2,41	0,51	1,85	2,80	122,1
„ „ + Bact. grac. s	—	1,94	0,60	1,28	1,90	168,5
„ „ + Bact. grac. s + Hefe	44,5	2,94	1,00	1,84	2,56	69,5

Zweite Abt Bd. 36.

15

Aus den in der Tabelle 36 mitgeteilten Resultaten läßt sich ein Abbau der Säure durch die Bakterien allein deutlich erkennen, und zwar war er bei a und g ein fast vollständiger, während bei dem schwächeren s nur etwa die Hälfte der Säure verschwunden ist. Nach dem Bisherigen muß angenommen werden, daß auch da, wo Hefe zugesetzt wurde, ein ähnlicher Vorgang stattfand; allein hier haben die Bakterien noch weiter gewirkt und dabei offenbar noch andere Substanzen (Zucker) abgebaut, wie aus der vermehrten Milchsäurebildung hervorgeht. Infolge dieser Säurebildung ist dann aber bei der Bestimmung der Gesamtsäure und flüchtigen Säure der Säureabbau nicht mehr deutlich zu erkennen. Vergleicht man die Mengen von Milchsäure und nicht flüchtiger Säure da, wo die Bakterien allein wirkten, so erkennt man, daß die Milchsäure in gebundener Form vorhanden sein muß, woraus hervorgeht, daß auch in diesem Saft die abgebaute Säure nicht als freie Äpfelsäure vorkam, sondern als saures äpfelsaures Salz, wahrscheinlich saures äpfelsaures Kalium.

Die mikroskopische Untersuchung der Bakterien ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen den 3 Rassen; bei s fanden sich etwas mehr die auf p. 224 beschriebenen langen knäuelartig verschlungenen Fäden, während bei den beiden übrigen a und g kurze Fäden und Kurzstäbchen vorherrschten. Zu eigentlicher Flockenbildung auf dem Flaschendepot wie im Schellerbirnsaft kam es hier nicht.

Wie *Bacterium mannitolpæum* (p. 196) wirkte auch *Bacterium gracile* in verschiedener Weise auf die Hefe ein. In einem Fall (Schellerbirnsaft) übte es keine Wirkung aus; es war vor Zusatz der Hefe gar nicht gewachsen. Im anderen Falle (Reinholzbirnsaft) trat wiederum infolge des anfänglich kräftigeren Wachstums der Bakterien eine starke Hemmung der Alkoholgärung ein. Dagegen machte sich in beiden Fällen, namentlich im ersteren, ein günstiger Einfluß der Hefe auf das Bakterienwachstum bemerkbar.

Bei der spontanen Vergärung von Obst- und Traubensäften, wobei Hefen und Bakterien gleichzeitig in den Saft gelangen, bemerkt man, daß der Säureabbau durch Bakterien erst nach der alkoholischen Gärung auftritt, oft direkt nachher oder auch nach Verfluß einiger Zeit. Vom *Bacterium mannitolpæum* haben wir bereits erwähnt, daß es nicht selten auch schon während der Gärung auftritt. Es schien von Interesse, das Verhalten von *Bacterium gracile*, eines typisch säureabbauenden Organismus, nach dieser Richtung hin noch etwas genauer zu beobachten.

In einem ersten Versuch verwendete man einen säurereichen Äpfelsaft (von der Lokalsorte „Dohuber Wildling“). Nach der üblichen Vorbehandlung (Sterilisation usw.) wurde in einem Teil der Flaschen die Weinhefe Aßmannshausen 5, in dem anderen gleichzeitig diese Hefe und *Bacterium gracile* a ausgesät. Die mit Gärverschlüssen versehenen Flaschen ließ man während 7 Wochen bei einer Temperatur von 16° stehen. Es trat in allen Flaschen eine kräftige alkoholische Gärung und nach deren Beendigung eine vollständige Klärung ein. Ca. 4—5 Wochen nach Versuchsbeginn zeigte sich in den Flaschen mit dem *Bacterium gracile* a eine erneute Trübung und Gasentwicklung. Zu dieser Zeit hatte die Gesamtsäure schon um 1°/oo abgenommen. Trübung und Gasentwicklung

hielten dann noch längere Zeit an, und erst nach deren Abschluß und eintretender Klärung (7 Wochen nach Versuchsbeginn) wurden die Obstweine untersucht.

Tabelle 37.

	Zucker	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Dohuber Äpfelsaft, steril	84,39	—	8,98	0,12	8,85	0,86	121,3
„ „ + Hefe Assmannshausen 5	0,83	40,26	8,44	0,45	7,95	1,18	26,6
„ „ + Hefe Assmannshausen 5 + Bact. gracile a	0,78	40,38	3,75	0,54	3,16	6,52	23,2

In diesem Falle hat das *Bacterium gracile a* die alkoholische Gärung nicht nachteilig beeinflusst, was wohl damit zusammenhängt, daß es, wie die Trübung erkennen ließ, erst nachträglich sich stärker vermehrte. Bei Gegenwart des Bacteriums wurde der Zucker ebenso vollkommen vergoren und auch ebensoviel Alkohol erzeugt wie da, wo die Hefe allein wirkte. Letzterer Umstand zeigt uns auch, daß das Bacterium keinen Zucker angriff. Das geht auch deutlich aus der geringen Vermehrung des Gehaltes an flüchtiger Säure hervor (nur um 0,09 g) trotz des starken Abbaues der Säure und ausgiebiger Milchsäurebildung. Der Gesamtsäuregehalt wurde durch diesen Abbau von 8,44‰ auf 3,75 erniedrigt, wenn wir annehmen, was wohl berechtigt ist, daß in den Flaschen, wo das Bacterium nachträglich zur Entwicklung gelangte, die Hefe die gleichen Umsetzungen vollzog wie da, wo sie allein war. Der Gehalt an Milchsäure stieg durch das Bacterium von 1,18 auf 6,52 g. Es ist von Interesse, aus der durch die Hefe unverändert gebliebenen nicht flüchtigen Säure 7,95 g die Menge der Milchsäure zu berechnen, die daraus entstehen kann. Es ergibt dies, wenn wir von der geringen Menge Bernsteinsäure absehen und die 9,95 g als freie Äpfelsäure annehmen, nach der Formel 5,34 g Milchsäure. Zählen wir dazu noch die in dem nur durch Hefe vergorenen Weine gefundene Milchsäuremenge von 1,18 g, die voraussichtlich als gebunden zu betrachten ist, also in der nicht flüchtigen Säure nicht inbegriffen ist, so erhalten wir 6,52 g Milchsäure; zufälligerweise wurden auch durch die Analyse 6,52 g gefunden. *Bacterium gracile a* hätte also die Äpfelsäure glatt abzubauen vermocht, ohne Erzeugung merklicher Mengen von flüchtiger Säure, unter Bildung von 67% Milchsäure. Da aber ein solcher theoretisch möglicher Abbau durch Bakterien nicht anzunehmen ist und da wir außerdem die Bernsteinsäure nicht berücksichtigt haben, so ist wohl anzunehmen, daß mehr Äpfelsäure vorhanden war, als aus der direkten Bestimmung hervorgeht, daß also ein Teil derselben in gebundener Form sich vorfand. Damit stimmt auch die Form, in der sich die Milchsäure findet, überein.

Die 3,16 g nicht flüchtige Säure ergeben, sofern wir alles als Milchsäure annehmen, was ja nicht ganz der Fall ist, in Milchsäure umgerechnet, 4,24 g, woraus hervorgeht, daß von den 6,52 g Milchsäure mindestens 2,28 g als gebundene vorhanden waren.

Die Bakterien im Trub erwiesen sich als zarte kürzere, geknickte, kurzgegliederte Fäden, eine der charakteristischen Wachstumsformen des *Bacterium gracile*.

Bei einem zweiten ähnlichen Versuch mit dem gleichen Äpfelsaft (Dohuber Wildling) wurde bei einem Teil der Flaschen an Stelle von *Bacterium gracile* a die Rasse w verwendet. Die Versuchsdauer erstreckte sich auf 7—8 Wochen, die Versuchstemperatur betrug 19°. Im Anschluß daran wurde auch noch ein ähnlicher Versuch mit dem gleichen *Bacterium w*, aber in Theilersbirnsaft durchgeführt.

Tabelle 38.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Dohuber Äpfelsaft, steril	8,98	0,12	8,85	0,86
„ „ + Hefe	8,37	0,35	7,98	1,00
„ „ + Bact. gracile w	7,40	0,25	7,13	2,46
„ „ + Hefe + Bact. gracile w	4,15	0,54	3,56	5,62
Theilersbirnsaft, steril	5,02	0,41	4,57	0,56
„ „ + Hefe	5,76	0,42	5,30	1,56
„ „ + Bact. gracile w	2,27	1,09	1,08	3,14
„ „ + Hefe + Bact. gracile w	3,35	1,68	1,50	4,94

Sowohl bei Gegenwart der Hefe als bei Abwesenheit solcher konnte das *Bacterium gracile* w gedeihen und Umsetzungen vollziehen. Doch hat die Hefe unverkennbar einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung des Bacteriums ausgeübt, was schon aus den Ziffern der ersten Kolonne zu ersehen ist. Bei Gegenwart der Hefe betrug die Abnahme der Gesamtsäure im Äpfelsaft mehr als doppelt so viel als da, wo das *Bacterium* allein wirkte. Daß man es bei dieser Bakterientätigkeit ausschließlich mit einem Säureabbau und nicht etwa mit einer Umsetzung des Zuckers zu tun hat, geht deutlich aus der geringen Bildung von flüchtiger Säure hervor. Das Verschwinden der Äpfelsäure erkennt man am besten am Verhalten der nicht flüchtigen Säure und der Milchsäure. Um nur eines hervorzuheben, weist die große Menge von Milchsäure, die beim Zusammenwirken von Hefe und Bakterien entstand, darauf hin, daß sehr viel Äpfelsäure abgebaut wurde. Durch Berechnung ergibt sich, daß aus 7,98 g nicht flüchtiger Säure, wenn wir alles als freie Äpfelsäure oder saures äpfelsaures Kalium betrachten und z. B. von der Bernsteinsäure absehen, 5,36 g Milchsäure entstehen können. Berücksichtigt man noch, daß ein Teil oder alle ursprünglich vorhandene Milchsäure in gebundenem Zustand vorkam und addiert diese Zahl zu der berechneten Milchsäure, so erhält man eine der gefundenen Milchsäuremenge ziemlich nahe stehende Zahl ($5,36 + 0,86 = 6,22$). Wenn man von der Hefetätigkeit absieht, so wurden neugebildet $5,62 - 1,00 = 4,62$ g Milchsäure und zwar aus 7,98 g verschwundener Äpfelsäure. Es wäre demnach hier aus 100 g Äpfelsäure nur 58 g Milchsäure entstanden. Wir müssen aber daran erinnern, daß die 7,98 g nicht flüchtige Säure nicht nur aus Äpfelsäure, sondern daneben auch aus Bernsteinsäure usw. bestanden und daß nur

beim Abbau der Äpfelsäure Milchsäure entsteht. Im übrigen bildet dieser Versuch eine Bestätigung des vorhergehenden.

Die von uns schon öfter hervorgehobene Empfänglichkeit der Theilersbirnsäfte für Bakterienkrankheiten weist darauf hin, daß sie für die genannten Organismen ein sehr geeignetes Nährmedium bilden. Damit steht denn auch das Verhalten des Theilersbirnsaftes in vorstehendem Versuche (Tabelle 38) in einem gewissen Zusammenhang. Während sonst *Bacterium gracile* bei Gegenwart von Äpfelsäure und Zucker streng selektiv verfährt und erst die Säure abbaut, so hat hier offenbar schon eine Zersetzung von Zucker stattgefunden, bevor alle Äpfelsäure verschwunden war. Das geht aus dem ziemlich hohen Gehalt an flüchtiger Säure und der verhältnismäßig geringen Menge neugebildeter Milchsäure hervor, da, wo *Bacterium gracile* allein wirkte. Wo Hefen und Bakterien zusammenwirkten, sind 4,38 g Milchsäure neu gebildet worden, eine Menge, die diejenige weit überschreitet, die aus der vorhandenen Äpfelsäure, sofern dieselbe frei war, durch Abbau entstehen könnte. Die gesamte nicht flüchtige Säure 4,57 g (als freie Äpfelsäure) würde nach der Formel nur 3,07 g Milchsäure liefern. Das deutet darauf hin, daß auch Zucker abgebaut wurde; die verhältnismäßig große Menge flüchtiger Säure 1,68 g könnte sogar vermuten lassen, daß schon ziemlich viel Zucker abgebaut worden, bevor alle Säure verschwunden war, wie dies ja auch tatsächlich der Fall war, wo das *Bacterium* allein wirkte.

Bei den mitgeteilten Versuchen mit Äpfel- und Birnsäften hatte ein glatter Abbau der Äpfelsäure stattgefunden. Das *Bacterium* vermochte selbst bei einem hohen Säuregehalt von 9‰ noch gut zu gedeihen. Bei gleichzeitiger Aussaat von Reinhefe und *Bacterium gracile* vermehrte sich zuerst die Hefe und vergärte den Zucker; dann erst trat die Äpfelsäuregärung durch die Bakterien ein. Dementsprechend übten die Bakterien auf die Alkoholgärung keinen oder jedenfalls nur geringen (Theilersbirnsaft) Einfluß aus. Dagegen hat die Anwesenheit der Hefe die nachfolgende Entwicklung der Bakterien wesentlich gefördert.

14. *Bacterium gracile* in Obst- und Traubenweinen.

Während man bei den im vorigen Abschnitte mitgeteilten Versuchen die Bakterien unvergorenen Säften zufügte, sollen jetzt einige mitgeteilt werden, bei denen in fertig vergorenen Weinen durch Zusatz von Bakterien der Säureabbau herbeigeführt wurde. Ein einfaches klares Bild von diesem Vorgang gibt folgender Versuch mit einem Apfelwein aus „Weinäpfeln“, der im Keller gut vergoren und sich schön geklärt hatte. Der dem Faß entnommene Apfelwein wurde in Gärflaschen gefüllt, sterilisiert und mit *Bacterium gracile* w geimpft. Die Gärflaschen erhielten Gärverschlüsse und wurden vom 9. März an während 40 Tagen bei 19° aufgestellt. Erst am 1. April, also 3 Wochen nach Beginn des Versuches, begann die Bakteriengärung, die dann allerdings rasch zunahm, und am 3. April ihren Höhepunkt erreichte und am 18. April vollständig beendet war.

Die Zuckerbestimmung beweist, daß bei dieser Bakterientätigkeit kein Zucker zersetzt wurde. Es fand also ein reiner Säureabbau statt, der den

Tabelle 39.

	Zucker	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Weinäpfelwein, steril	3,25	42,36	12,06	0,35	11,67	0,66	32,1
„ + Bact. gracile w	3,24	42,72	6,09	0,43	5,62	7,74	—

Gesamtsäuregehalt auf die Hälfte herabsetzte. Geht man von der Ansicht aus, die nicht flüchtige Säure sei nur Äpfelsäure und sei vollständig abgebaut worden, so ergäbe sich aus den 11,67 g Äpfelsäure 7,83 g Milchsäure. Da hierzu noch die ursprünglich vorhandene Milchsäure zu addieren wäre, so bekäme man 8,49 g Milchsäure, also etwa 0,7 g mehr als wirklich gefunden wurde. Dieser Rechnung liegt aber eine falsche Annahme zugrunde, indem die nicht flüchtige Säure bei einem vergorenen Apfelwein nicht nur aus Äpfelsäure besteht, sondern z. T. auch aus Bernsteinsäure und vielleicht noch geringen Mengen anderer Säuren, die das Bacterium nicht anzugreifen oder nicht unter Milchsäurebildung abzubauen vermag. Dieser Umstand war ja auch bei den Versuchen des vorigen Abschnittes in Betracht zu ziehen, wo die Bakterien nicht in sterilen Säften wirkten, sondern erst die Gärtätigkeit aufnahmen, als die Hefe bereits die Alkoholgärung vollzogen hatte. Berechnen wir die Ausbeute an Milchsäure aus der anfänglich vorhandenen nicht flüchtigen Säure 11,67 g, so erhalten wir auf 100 g Äpfelsäure 60,7 g Milchsäure, während es nach der Formel 67,2 g sein sollten. Diese Minderausbeute ist nun zum Teil eben auf den Umstand zurückzuführen, daß die nicht flüchtige Säure nicht ausschließlich Äpfelsäure war, wozu dann noch kommt, daß die Bakterien vielleicht auch noch Äpfelsäure zu ihrem Aufbau verwenden.

Dieser Versuch liefert wiederum den Beweis, daß beim Abbau der Äpfelsäure durch *Bacterium gracile* keine oder nur eine ganz unbedeutende Menge flüchtiger Säure gebildet wird.

Die nachfolgenden Versuche sind mit vergorenen Traubenweinen angestellt worden. Bei einem derselben, der in ganz gleicher Weise wie mit *Bacterium mannitolpæum* (p. 196) durchgeführt wurde, verwendete man einen 1910er Clävner Wein sofort nach seiner Klärung im Faß. Dieser Wein, der 80,3 g Alkohol, einen hohen Säuregehalt von 10,01 g (als Äpfelsäure), 0,34 g flüchtige Säure (als Essigsäure) und 1,01 g Milchsäure aufwies, wurde z. T. direkt zum Versuch verwendet, z. T. in etwas durch Calciumkarbonat entsäuertem Zustande. Letzterer enthielt dann nur 6,80‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure). In beiden Fällen wurden einzelne Flaschen dieses Weins mit einer Kahlhefe in Reinkultur, oder mit *Bacterium gracile* a und in einer dritten Versuchsreihe mit den beiden Organismen zusammen beschickt. Da nun das Bacterium in keiner Versuchsreihe zur Entwicklung gelangte, so kann hier von einer detaillierten Angabe der Versuchsergebnisse abgesehen werden. Dagegen wollen wir doch die Tatsache, daß das sonst hohe Säuregrade ertragende Bacterium hier nicht gedieh, besonders hervorheben. Zwar vermögen wir einen Grund für dieses Nichtgedeihen nicht anzugeben; allein es zeigt uns das Vorkommnis

aufs Neue, wie sehr das Auftreten von Bakterien im Wein von verschiedenen Eigenschaften desselben abhängig sein kann. Beim *Bacterium mannito-pæum*, das ebenfalls in diesem Weine nicht wuchs, hat uns dieses Verhalten nicht befremdet, da es empfindlich gegen höhere Säuregrade und nicht geeignet für Säureabbau in vergorenen Weinen ist. Der Gedanke, es möchte die Säure in dem betreffenden Wein vielleicht nicht Äpfelsäure gewesen sein, ist nicht zutreffend, denn ein Vertreter der noch zu besprechenden dritten Gruppe vermochte diese Säure in dem teilweise entsäuerten Wein unter Bildung von Milchsäure abzubauen. Berücksichtigen wir die auf p. 221 dargelegte große Empfindlichkeit des *Bacterium gracile* gegen Gerbstoff, so könnte man denken, daß der Gerbstoffgehalt dieses Rotweines das Nichtgedeihen verursachte, eine Vermutung, die aber angesichts anderweitiger Beobachtungen nicht zutreffend sein kann.

Die nachfolgenden 2 Versuche verfolgten hauptsächlich den Zweck, das Verhalten des *Bacterium gracile* in Weinen, die nicht vollständig vergoren waren, d. h. noch etwas Zucker enthielten, genauer kennen zu lernen; bekanntlich sind es gerade unvollständig ausgegorene Weine, die häufig Bakterienkrankheiten anheimfallen. Es kamen dabei ein Rotwein (Clävner) und ein Weißwein (Gutedel) zur Verwendung. Um das Wachstum der Bakterien zu fördern, wurde der Rotwein durch Vergärung des Saftes an den von Kernen und Kernen befreiten Beerenhäuten gewonnen. Infolgedessen enthielt er weniger Gerbstoff als ein in gewöhnlicher Weise hergestellter Rotwein. Zudem wurde der Säuregehalt durch reines kohlensaures Calcium beträchtlich herabgesetzt. Den gewünschten Zuckergehalt verschaffte man dem Wein durch Zusatz von unvergorenem Traubensaft (Räuschling). Ursprünglich enthielt der Wein pro Liter 0,86 g Invertzucker, 73,36 g Alkohol, 7,61 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure), 0,36 g flüchtige Säure (Essigsäure), 1,01 g Milchsäure und 24,2 g Extrakt. Die nachträgliche Zusammensetzung ist aus Tabelle 40, Zeile 1 zu ersehen. Die Versuchsanstellung war auch sonst die gleiche wie bei *Bacterium mannito-pæum* (p. 197).

Tabelle 40.

	Zucker	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Spätburgunderwein (Clävner), steril	10,47	67,36	2,94	0,14	2,79	1,57	32,4
„ „ + Bact. gracile a	8,10	67,1	1,60	0,53	1,02	4,50	29,2
„ „ + Bact. gracile g	2,72	66,9	2,94	1,10	1,73	5,26	28,1
„ „ + Bact. gracile s	3,65	67,3	2,73	1,03	1,60	4,72	28,5

Für das Verständnis der in der Tabelle dargestellten Ergebnisse ist der Verlauf der Bakteriengärung nicht ohne Bedeutung. Am 15. Juli, 10 Tage nach Beginn des Versuches, zeigte sich in den Flaschen mit *Bacterium gracile a* schon eine ziemlich starke Gasentwicklung, während *Bacterium gracile g* und *s* nur schwach gärten. Am 23. Juli war die

Gasentwicklung bei *Bacterium a* nur noch gering, während jetzt eine lebhaftere Entwicklung bei *g* und *s* eintrat. Am 1. September wurde die Untersuchung der verschiedenen Weine vorgenommen. An diesem Tage erschien der mit *Bacterium gracile a* vergorene Wein klar, besaß aber einen braunschwarzen Farbenton (Folge des Säureabbaues) und auf der Oberfläche ein glattes spiegelndes Häutchen. Bei *Bacterium gracile s* war der Wein eher heller rot als ursprünglich (Folge der Säurebildung); die Oberfläche wies ebenfalls ein spiegelndes Häutchen auf. Der Wein erschien noch etwas trüb. Bei *Bacterium gracile g* war der Wein hellrötlich, stark getrübt und ebenfalls an der Oberfläche mit einem zarten Häutchen bedeckt. Von den Versuchsweinen besaßen die mit *Bacterium gracile s* und *g* einen etwas unreinen Geschmack. Das Depot der Weine zeigte keine große Verschiedenheit. Bei allen beobachtete man die charakteristischen zarten gegliederten Fäden von verschiedener Länge; bei *Bacterium gracile a* traten diplokokkenartige Kurzstäbchen stärker in den Vordergrund.

Aus dem Verhalten des Zuckers (Kolonne 1) ist zu ersehen, daß das *Bacterium a*, das mit der Gärung zuerst einsetzte, sich in der Hauptsache mit dem Säureabbau begnügte und nur wenig Zucker zum Verschwinden brachte. Die beiden anderen *g* und *s* dagegen, obgleich später sich entwickelnd, haben sich schließlich energisch an den Zucker gemacht und so in gewissem Sinne als Mannitbakterien, nur etwas schwächer als die Bakterien der *Bacterium mannitopæum*-Gruppe (Tabelle 20, p. 198), gewirkt. Damit stimmt dann auch die Gesamtsäure überein, die bei *a* eine Abnahme erfuhr, bei *g* und *s* anfänglich auch abgenommen, dann aber wieder zugenommen hat. Auch die Bildung flüchtiger Säure steht hiermit in vollem Einklang. Milchsäure fand sich bei allen 3 Bakterien in größeren Mengen. Bei *Bacterium gracile a* findet sich mehr als die Hälfte derselben in gebundener Form, was beweist, daß bei ihrer Bildung saures äpfelsaures Salz, wahrscheinlich saures äpfelsaures Calcium abgebaut wurde, wodurch das zur Bindung der Milchsäure notwendige Calcium frei wurde. Bei *Bacterium gracile g* und *s* befinden sich größere Mengen Milchsäure in freiem Zustande. Trotz Bildung erheblicher Mengen Milchsäure hat die Gesamtsäure hier nicht zugenommen. Es muß also auch da ein Säureabbau stattgefunden haben neben der Vergärung größerer Zuckermengen. Bei *Bacterium g* hat der Extraktgehalt um 4,3 g abgenommen. Berücksichtigt man, daß 7,75 g Zucker zersetzt wurden und daß der Gehalt von nicht flüchtiger Säure infolge des Abbaues von Äpfelsäure und der Bildung von Milchsäure ziemlich unverändert blieb, so kommt man zu dem Schluß, daß bei der Umsetzung des Zuckers ein neuer Extraktstoff gebildet wurde, nämlich ca. 3 g Mannit. Ähnlich verhielt es sich auch beim *Bacterium s*, während bei *Bacterium a* wohl nur Spuren von Mannit gebildet worden sind.

In gleicher Absicht wie der vorige Versuch wurde ein solcher mit einem Weißwein (Gutedel) durchgeführt. Der verwendete Wein enthielt ursprünglich 90,04 g Alkohol, 1,69 g Invertzucker, 6,00 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure), 0,32 g flüchtige Säure (als Essigsäure) und 16,8 g Extrakt pro Liter. Um dem Wein den gewünschten Zuckergehalt zu verschaffen, wurde 14 Liter desselben ein Liter unvergorener Gutedelsaft zugefügt und dann das Gemisch mit reinem Calciumkarbonat teilweise entsäuert. Die Zusammensetzung des so veränderten Weines zeigt Tabelle 41, Zeile 1. Die

Versuchsanstellung war die gleiche wie bei *Bacterium mannitopæum* (p. 199). Versuchsdauer 2 Monate; Temperatur 19°.

Von den am 2. Dezember angesetzten Versuchsflaschen trübte sich hier der Wein mit *Bacterium gracile g* zuerst, am 18. Dezember; erst nachher folgten die Bakterien *a* und *s*, die überhaupt keine starke Entwicklung erreichten, während *g* bis zu Ende des Versuches den Wein trübte. *Bacterium gracile a* und *s* haben sich hier auf einen teilweisen Abbau der Säure beschränkt, und der geringen Entwicklung entsprechend auch nicht viel Milchsäure gebildet. *Bacterium g* hat sich wiederum kräftiger erwiesen und sich nicht nur auf den Säureabbau beschränkt, sondern auch noch etwa die Hälfte des vorhandenen Zuckers (8,9 g) umgesetzt. Hierbei fand eine erhebliche Vermehrung des Gesamtsäuregehaltes statt, ebenso eine Vermehrung der Essigsäure und Milchsäure. Zieht man die Menge des verschwundenen Zuckers in Betracht, so erscheint die Bildung der Milchsäure als eine auffallend geringe und wir gelangen hier zu einer ähnlichen Schlußfolgerung, wie wir sie beim Verhalten des *Bacterium mannitopæum* in diesem Wein (p. 200) gezogen haben, daß nämlich der Zucker, und zwar die Lävulose, abgebaut wird unter Bildung von Mannit und nur wenig flüchtiger Säure und Milchsäure. Möglicherweise, daß die Lävulose bei der Vergärung durch diese Bakterien direkt in Mannit umgewandelt wurde und die flüchtige Säure und Milchsäure von der Zersetzung von Dextrose und der abgebauten Säure herrühren. Daß dem verschwundenen Zucker entsprechend viel Mannit gebildet wurde, geht aus der geringen Abnahme des Extraktes hervor.

Tabelle 41.

	Zucker	Gesamtsäure als Apfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Apfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Gutedelwein, steril	17,5	2,06	0,26	1,77	1,12	29,9
„ + <i>Bact. gracile a</i>	17,25	1,53	0,36	1,13	1,40	28,8
„ + <i>Bact. gracile g</i>	8,59	3,63	1,38	2,11	3,03	26,6
„ + <i>Bact. gracile s</i>	17,4	1,60	0,33	1,24	1,50	29,4

Zur Zeit der Untersuchung waren die mit *Bacterium a* und *s* vergorenen Weine vollständig klar und zeigten die schöne hellgoldgelbliche Färbung der nicht infizierten Weine; bei *Bacterium gracile g* war die Farbe ähnlich, der Wein aber noch trüb. Auch im Geschmack waren die Weine mit *Bacterium a* und *s* nur wenig verändert, während der mit *Bacterium gracile g* stärkere Veränderungen aufwies, in Geruch und Geschmack unangenehm säuerlich erschien und zudem einen unreinen, nicht definierbaren Geschmack zeigte, wie man ihn hie und da bei verdorbenen Weinen findet. Während *Bacterium mannitopæum* in diesem Wein einen deutlichen Mäuselgeschmack erzeugte, war dies bei keiner der verschiedenen *Bacterium gracile*-Rassen der Fall. Die Untersuchung des Trubes ergab, daß *Bacterium gracile a* und *s* in Form von sehr zarten Stäbchen und gegliederten Fäden sich vorfanden; bei *Bac-*

terium gracile g herrschten mehr zarte Stäbchen vor, die oft diplokokkenartig zu zweien vereinigt waren.

Bei einem Rückblick auf die in diesem und dem vorigen Abschnitt mitgeteilten Versuchsergebnisse ergibt sich, daß bei den verwendeten Apfelweinen *Bacterium a* und *w* sich auf den Abbau von Äpfelsäure unter Bildung von äußerst wenig flüchtiger Säure und viel Milchsäure beschränkten, selbst dann, wenn unvergorener Zucker gegenwärtig war; in den soeben besprochenen entsäuerten und zuckerhaltigen Traubenweinen (Spätburgunder und Gutedel), sowie im gärenden Theilersbirnwein haben sich die Bakterien, besonders *Bacterium gracile* g, abweichend verhalten, indem sie neben der Äpfelsäure gleichzeitig auch noch Zucker vergärten unter Bildung von verhältnismäßig viel flüchtiger Säure.

Auch bei diesem *Bacterium* wurde der Einfluß eines im Wein verbleibenden Hefetrubes auf das Gedeihen untersucht und zwar bei den gleichen Gutedel- und Räuschlingweinen wie beim *Bacterium mannitolpœum* (p. 201). Beide mit Reinhefe vergorenen Weine wurden teils direkt, teils in entsäuertem Zustande verwendet; im übrigen sei bezüglich Versuchsanstellung auf p. 200 verwiesen. Der Alkoholgehalt des Weines betrug pro Liter 80 g, die anfängliche Gesamtsäure 7,08 g (Äpfelsäure), die flüchtige Säure 1,10 g (als Essigsäure). Dauer des Versuchs 10 Monate, Temperatur 19°.

Tabelle 42.

	Gesamtsäure g im l als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Gutedelwein (entsäuert), vor der Infektion	3,38	1,13	2,14	—
„ ohne Hefe + <i>Bact. gracile a</i>	3,13	1,56	1,41	2,12
„ mit Hefe (sterilisiert) + <i>Bact. gracile a</i>	2,60	1,36	1,10	2,34
„ mit Hefe (lebend) + <i>Bact. gracile a</i>	2,27	1,26	0,88	2,24
„ (nicht entsäuert) vor der Infektion	7,08	1,10	5,87	—
„ „ „ mit Hefe (sterilisiert) + <i>Bact. gracile a</i>	7,00	1,00	5,90	0,54

Wie aus den in der Tabelle 42 mitgeteilten Resultaten zu ersehen ist, haben die Bakterien im teilweise entsäuerten Wein keine tiefgreifenden Veränderungen hervorgerufen; dennoch ist eine Wirkung unverkennbar und zwar eine etwas weitergehende als beim *Bacterium mannitolpœum* im gleichen Wein (p. 01); im nicht entsäuerten vermochte auch *Bacterium gracile* nicht zu wachsen. Die Veränderung im entsäuerten Wein läßt sich als Säureabbau bezeichnen; der Gehalt an nicht flüchtiger Säure sank in einem Fall von 2,14 g auf 0,8 g (als Äpfelsäure). Es ist die Äpfelsäure im sauren äpfelsauren Calcium abgebaut worden und was jetzt als nicht flüchtige Säure erscheint, ist Bernsteinsäure, freie Milchsäure usw. Die Anwesenheit der Hefe scheint einen kleinen kaum beachtenswerten Einfluß ausgeübt zu haben.

Den verhältnismäßig nicht sehr starken Umsetzungen entsprechend zeigten sich die Weine auch bei der Kostprobe wenig verändert. Im Trub fanden sich die charakteristischen Formen des *Bacterium gracile*; in den Flaschen ohne Hefe und in denjenigen mit durch Sterilisation getöteter Hefe erschienen sie als schöne lange zarte Fäden und Kurzstäbchen; in den Flaschen mit lebender Hefe dagegen traten mehr Kurzstäbchen auf, die mit wenig langen Fäden vermischt waren.

Zu einem gleichen Versuche wurde auch ein Räuschlingwein benutzt, der 8,61 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure) aufwies. Auch dieser wurde direkt verwendet, sowie in teilweise entsäuertem Zustande, so daß er noch 5,61 g Gesamtsäure besaß. Während in dem nicht entsäuerten Wein die Entwicklung der Bakterien nur sehr langsam vor sich ging und man daher die Untersuchung der Weine erst nach 10 Monaten vornahm, fand in dem entsäuerten Wein eine raschere Umsetzung statt; man untersuchte diese Weine 86 Tage nach Beginn des Versuches. Versuchstemperatur 19°.

Tabelle 43.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Räuschlingwein (entsäuert) vor der Infektion	5,61	0,46	5,10	0,92
„ „ ohne Hefe + Bact. gracile a	3,54	1,03	2,41	4,50
„ „ mit Hefe (sterilisiert) + Bact. gracile a	3,47	1,10	2,26	5,04
„ „ mit Hefe (lebend) + Bact. gracile a	3,47	1,08	2,28	4,86
„ (nicht entsäuert) vor der Infektion	8,61	0,46	8,10	0,92
„ „ mit Hefe (sterilisiert) + Bact. gracile a	6,20	0,67	5,46	3,70
„ „ mit Hefe (lebend) + Bact. gracile a	6,14	0,62	5,46	3,24

Sowohl das Verhalten der Gesamtsäure als das der nicht flüchtigen Säure lassen beim entsäuerten Wein einen deutlichen Säureabbau durch das *Bacterium* erkennen. Der Gehalt an nicht flüchtiger Säure ist auf mehr als die Hälfte des ursprünglichen gesunken. Es kann schon daraus geschlossen werden, daß die anfänglich vorhandene Äpfelsäure zu einem großen Teil abgebaut wurde. Es geht dies aber auch aus der großen Menge neugebildeter Milchsäure hervor. Ein kleiner Teil dieser Milchsäure mag allerdings seine Entstehung der Umsetzung von etwas unvergoren gebliebenem Zucker verdanken, denn daß eine solche stattfand, kann wohl aus der ziemlichlichen Menge flüchtiger Säure geschlossen werden.

Charakteristisch für das *Bacterium gracile* ist nun, daß es auch in dem nicht entsäuerten Wein trotz des hohen Säuregehaltes noch zu gedeihen vermochte, was dem *Bacterium mannitolopœum* nicht möglich war (p. 201). Allerdings konnte es hier trotz der langen Versuchsdauer von 10 Monaten die Säure nur zum Teil abbauen. Doch ging der Gehalt an nicht flüchtiger Säure von 8,10 g auf 5,46 g herunter und da in der

letztenannten Zahl voraussichtlich noch die neugebildete Milchsäure inbegriffen ist, so wird man annehmen dürfen, daß nahezu die Hälfte der ursprünglich vorhandenen nicht flüchtigen Säure durch das *Bacterium* abgebaut wurde. Dieser Abbau würde aber in dem vorliegenden Fall genügen, einen unangenehm sich bemerkbar machenden hohen Säuregehalt des Weines auf einen annehmbaren Grad herabzusetzen. Die geringe Zunahme an flüchtiger Säure weist auf reine Äpfelsäuregärung durch das *Bacterium gracile* in diesem Weine hin.

Hier übte die Anwesenheit des Hefetrubes gar keinen Einfluß auf das Wachstum und die Wirkung der Bakterien aus. Sämtliche Weine, in denen das *Bacterium gracile* einen Säureabbau vollzogen hatte, schmeckten, wie zu erwarten war, weniger sauer als der ursprüngliche. Sie waren rein von Geschmack und schmeckten auch weniger sauer als diejenigen, die mit *Bacterium mannitolpæum* infiziert worden waren. Dieses vermochte zwar ebenfalls etwas Säure abzubauen, allein durch die aus Zucker mehr produzierte Milchsäure blieb die Gesamtsäure auf der gleichen Höhe wie beim ursprünglichen entsäuerten Wein.

Von den 2 Weinen erwies sich der Gutedelwein als für das Bakterienwachstum weniger günstig; im entsäuerten wuchs *Bacterium gracile* wenig, im nicht entsäuerten gar nicht. Im Räuschlingwein vermochten die genannten Bakterien trotz höherer Säuregrade zu wachsen und zwar sowohl im entsäuerten wie nicht entsäuerten und einen starken Säureabbau herbeizuführen. Der Säureabbau trat im Räuschlingwein reiner zutage. Die Anwesenheit des Hefetrubes vermochte beim Gutedelwein einen geringen, das Wachstum der Bakterien fördernden Einfluß auszuüben; beim Räuschlingwein war eine derartige Wirkung nicht zu erkennen.

III.

Micrococcus-Gruppe.

(*Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus*.)

A. Morphologisches Verhalten.

Wenn man den Trub von Weinen und Obstweinen, namentlich kranken, untersucht, so findet man häufig kokkenartige Bakterien, entweder allein oder neben stäbchenförmigen. Als Ursache des Lindwerdens der Weine hat Pasteur (1; p. 62) ein kokkenartiges *Bacterium* angesehen, das aber infolge Teilung nur nach einer Richtung in Form von Fäden auftreten kann, also zur Gattung *Streptococcus* gehört. Auch die von Kayser und Manceau (1) als Ursache des Lindwerdens der Weine studierten Bakterien würden hierher gehören. Aus stark faulig umgesetzten Weinen züchtete E. Kramer (1; p. 139) 2 zu *Micrococcus* gehörige Organismen, die er als *Micrococcus saprogenes vini* I und II bezeichnete, und von denen der erstere von Migula (1; Bd. 2, p. 118) als *Micrococcus vini* angeführt wird. Einen *Micrococcus* haben auch Mazé und Pacottet (1; p. 489) aus Weinen aus dem Kaukasus und der Champagne gewonnen, den sie aber nicht eingehender studierten und daher auch nicht benannt haben. Eine genaue Beschreibung fand dagegen ein den Säureabbau im Wein verursachender *Micrococcus*

durch W. Seifert (1; p. 8), nämlich der *Micrococcus malolacticus*.

Mikrokokken im Wein ohne weitere Untersuchung einfach als gleichwertig zu betrachten, und sie als *Micrococcus vini* ohne eingehendere Untersuchung zu bezeichnen, wie dies von Wortmann geschehen (4; p. 674), geht nicht an, da unter gleich aussehenden Bakterien doch morphologisch und physiologisch verschieden sich verhaltende Arten auftreten können. In der Tat haben auch unsere Untersuchungen und diejenigen von Seifert gezeigt, daß man in Weinen und Obstweinen ähnlich aussehenden Mikrokokken von sehr verschiedenem Verhalten begegnet. Zudem ist jetzt der Name *Micrococcus vini* zweimal vergeben, da auch Migula, wie bereits erwähnt, den *Micrococcus saprogenes* I Kramer so benannte.

Um die Mikrokokken der Weine zu studieren, züchteten wir aus Weinen und Obstweinen eine Anzahl derselben und zwar aus einem Reinholzbirnenwein (*Micrococcus acidovorax*), einen zweiten aus einem „siedenden“ Rotwein (Brestenberg am Hallwilersee, Kt. Aargau) (*Micrococcus variococcus h*), ferner einen solchen aus einem linden Elblingwein (Ossingen, Kt. Zürich) (*Micrococcus variococcus n*), einen weiteren aus einem kranken Rotwein (Rheintal, St. Gallen) (*Micrococcus variococcus m*) und endlich aus einem milchsäurestichigen Weißwein, dem Usterapfelwein zugefügt worden war, *Micrococcus variococcus l*. Wir möchten jetzt schon hervorheben, daß wir auf Grund der nachfolgenden Untersuchung diese Bakterien in 2 Gruppen bringen können, die, wie im Vorstehenden geschehen, als Arten zu bezeichnen sind: *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus*.

Um die Bakterien auf ihr morphologisches Verhalten zu prüfen, wurden sie, wie die schon besprochenen, in flüssigen Medien und festen Nährböden kultiviert. Im Gutedelwein, dem etwas Zucker zugefügt worden war, fand sich *Micrococcus acidovorax* (Taf. I, Fig. 6) meistens in Form von Tetraden (Pediokokken), d. h. 4-zelligen Verbänden, sodann auch in 3-zelligen und weniger häufig in Diplokokkenform oder als einzelne Kokken. Hie und da waren diese Gebilde zu Klümpchen vereinigt, so daß man an Sarcinen erinnert wurde; allein genauere Beobachtungen zeigten stets, daß die Bakterien sich nur nach 2 Richtungen teilten, also zur Gattung *Micrococcus* gehören. Die einzelnen Kokken zeigen einen Durchmesser von 0,5—0,7 μ . Die zweite Art, *Micrococcus variococcus h* ist robuster als die erste. Im Gutedelwein fanden sich die Tetradenformen häufig (Taf. I, Fig. 7). Ihre Zusammensetzung aus 4 Einzelkokken tritt oft nicht so scharf hervor, indem sie in der Mitte wie verschmolzen und nur am Rande deutlich erscheinen. Neben den Tetraden waren auch viele ähnlich beschaffene Dreier-Verbände, sowie Diplokokken und einzelne Kokken. Auch hier fanden sich häufig Vereinigungen von einer größeren Zahl von Kokken, die dann die Einzelkokken nur am Rande deutlich erkennen ließen. Der einzelne Coccus dieser Spezies zeigt einen Durchmesser von 0,75—1,14 μ . Von den übrigen Rassen des *Micrococcus variococcus* wurde nur *n* in diesem Gutedelwein genauer beobachtet. Sie wies fast vollständige Übereinstimmung mit der Rasse *h* auf; die Einzelbakterien zeigten 0,75—1,2 μ Durchmesser, einzelne sogar bis 1,5 μ (Taf. I, Fig. 8). Auch hier waren die Kokken oft zu größeren Tafeln vereinigt und nur an deren Rand deutlich wahrnehmbar. Bei intensiverer Beleuchtung konnte

man erkennen, daß auch die gleichmäßig aussehende Masse im Innern der Konglomerate aus deutlich abgegrenzten Kokken bestand.

Im Hefeauszug + Lävulose zeigte der *Micrococcus acidovorax* ein etwas anderes Aussehen als im Gutedelwein, insofern, als die Tetraden und Kokken nicht so zahlreich zu Konglomeraten miteinander verschmolzen waren. *Micrococcus variococcus h* verhielt sich in diesem Nährboden etwas abweichend, indem die Konglomerate hier eher noch etwas größer waren als im Gutedelwein. Auch in Hefeauszug + Lävulose zeigte *Micrococcus variococcus n* ziemliche Übereinstimmung mit *h*. Die beiden von uns auseinandergehaltenen Spezies: *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus h* und *n* unterscheiden sich in erster Linie durch die Größe der Einzelkokken, deren Durchmesser bei der ersteren 0,5—0,7 μ , bei der zweiten 0,75 bis 1,5 μ beträgt. Während bei *Micrococcus acidovorax* die Einzelkokken in der Größe mehr gleichmäßig erscheinen, zeigten sie bei *Micrococcus variococcus h* und *n* große Verschiedenheit. Selbst in der gleichen Tetrade sind oft die 4 Bakterien verschieden groß. So können z. B. 2 einen Durchmesser von 1,1 μ aufweisen, die beiden anderen nur einen solchen von 0,75 μ oder ausnahmsweise noch weniger. Das Verschmelzen zu größeren Konglomeraten wird bei *Micrococcus variococcus h* und besonders bei *Micrococcus variococcus n* in ausgesprochenerer Weise beobachtet als bei *Micrococcus acidovorax*. Während bei den übrigen Mikrokokken das Depot gewöhnlich fein mehlig erscheint, läßt sich bei *Micrococcus variococcus n* in Obstsäften (z. B. in Wasserbirnsaft) eine abweichende deutlich körnige Beschaffenheit beobachten, davon herrührend, daß das ganze Depot aus Zoogloeengruppen besteht, was ebenfalls erkennen läßt, daß dieses Bacterium nicht mit dem *Micrococcus variococcus h* identisch ist.

In den Nährgelatinekolonien (Tiefenkolonien) fanden sich die beiden *Micrococcus*-Arten als Einzelkokken, Diplokokken und Tetraden und zeigten sich hauptsächlich nur in der Größe der Einzelkokken verschieden. In den Riesenkolonien verhielt sich *Micrococcus acidovorax* ähnlich, während bei *Micrococcus variococcus* meist nur aus gleichmäßig beschaffenen Einzelkokken zusammengesetzte tafelartige größere Verbände zu beobachten waren.

Eigenbewegung wurde bei keiner der beiden Arten von *Micrococcus* beobachtet und ebenso fand man auch keine Kokken mit Sporen. Hinsichtlich der Gramschen Färbung verhielten sie sich positiv. Bei *Micrococcus acidovorax* wurden bei der Kultur in einem entsäuerten Schellerbirnsaft und in Clävner Wein deutliche Zoogloeen, in ersterem auch schön entwickelte Bakterienblasen beobachtet. Unter der Bezeichnung *Micrococcus cystiopæus* hat Müller-Thurgau (6; p. 396) einen aus Birnsaft gezüchteten Blasen bildenden *Micrococcus* aufgeführt. Da jedoch die Beschreibung unzureichend ist und wir den *Micrococcus* nicht mehr besitzen, ist es nicht möglich, ihn mit dem vorliegenden *Micrococcus acidovorax* zu vergleichen. Es wird auch unmöglich sein, ihn in Zukunft wieder zu identifizieren, weshalb wir vorziehen, den Namen *Micrococcus cystiopæus* fallen zu lassen.

Bei *Micrococcus variococcus m*, *n* und *l* haben wir bisher nur Zoogloeen beobachtet (z. B. bei *Micrococcus variococcus n*

in Reinholzbirnsaft), doch zweifeln wir nicht daran, daß in geeigneten Medien aus den Zoogloeen auch Blasen entstehen.

Die Tiefenkolonien unserer *Micrococcus*-Arten in Nährgelatine sind im Vergleich zu denen von *Bacterium mannitolæum* klein. (Taf. II, Fig. 25 u. Fig. 26). Sie erscheinen bei auffallendem Licht weiß, in durchfallendem braungelb, homogen. Sie sind rund, ganzrandig und verflüssigen die Gelatine nicht. Ausnahmsweise fanden sich auch, namentlich in jungen Stadien, zusammengesetzte, d. h. aus 2—4 Einzelkolonien bestehende Kolonien, wohl hervorgegangen aus Diplokokken oder Tetraden. Dementsprechend zeigen diese zusammengesetzten Kolonien auch nicht die wurmförmige Gestalt, wie dies bei *Bacterium mannitolæum* der Fall ist. Sie sind vielmehr fast rund. Auch in älteren Kulturen findet man Kolonien, die nicht genau kugelförmig sind. Die Größe der Kolonien hängt natürlich sehr von der Ernährung ab. Wir haben bei *Micrococcus acidovorax* wie bei *Micrococcus variococcus h* solche von 180 μ im Durchmesser beobachtet. Die Oberflächenkolonien sind bei *Micrococcus acidovorax* (Taf. II, Fig. 11) gleichmäßig rund, schildförmig und ganzrandig, während wir bei *Micrococcus variococcus h* solchen von nierenförmiger Gestalt begegneten.

Die Riesenkolonien erscheinen äußerst zart und haben Ähnlichkeit mit denen der verschiedenen Rassen von *Bacterium gracile* (Taf. II, Fig. 19 u. Fig. 20). Auch in der Ausdehnung zeigten sie mit diesen Ähnlichkeit und lassen sich also in dieser Beziehung leicht von denjenigen der *Bacterium mannitolæum*-Gruppe unterscheiden. Die Riesenkolonien von *Micrococcus variococcus h* übertrafen an Ausdehnung diejenigen von *Micrococcus acidovorax* bedeutend, indem ihr Durchmesser bei der ersteren Spezies z. B. 3,7 mm, bei letzterer dagegen nur 2,4 mm betrug. Erstere unterscheiden sich noch dadurch, daß sie ähnlich wie bei *Bacterium gracile g* einen erhabenen Rand aufweisen, was bei letzteren nicht der Fall ist. Nur bei mikroskopischer Beobachtung sieht man, daß der Rand etwas gelappt ist, und zwar bei *Micrococcus acidovorax* stärker als bei *Micrococcus variococcus h*.

Die von E. Kramer (1; p. 139) gezüchteten *Micrococcus saprogenes vini* I und II verflüssigen die Nährgelatine. Da dies bei keinem der unsrigen der Fall ist, so handelt es sich bei jenen offenbar um ganz andere Organismen, so daß wir auf dieselben nicht mehr weiter zurückzukommen brauchen. Dagegen zeigt der von Seifert beschriebene *Micrococcus malolacticus* eine gewisse Übereinstimmung mit unseren *Micrococcus*-Arten. In der Größe der Einzelkokken würde er unserem *Micrococcus variococcus h* oder *n* gleichen, da Seifert als Durchmesser desselben 1 μ angibt. Nicht ganz übereinstimmend ist die im Bild wiedergegebene Oberflächenkolonie mit stark gebuchtetem Rand, sowie das sonstige Verhalten, indem nach den Angaben von Seifert bei *Micrococcus malolacticus* Diplokokken und nur ganz vereinzelt Tetraden auftreten sollen. Auch die Prüfung der physiologischen Eigenschaften ergibt, daß *Micrococcus malolacticus* mit keiner der von uns aufgestellten Spezies identisch ist.

Bei den Strich- und Stichkulturen in Nährgelatine zeigt sich der *Micrococcus acidovorax* im Wachstum den anderen etwas überlegen, was vielleicht darauf beruht, daß er in der zur Anzucht

benützten Flüssigkeit besser gedeiht und infolgedessen ein reicheres Ausaatmaterial liefert. Die Striche sind zart, ähnlich wie bei *Bacterium gracile* und auch bei den Stichkulturen zeigten sich die bei *Bacterium gracile* angegebenen Erscheinungen. Eine Verflüssigung der Gelatine trat hier ebenfalls nicht ein.

B. Physiologisches Verhalten von *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus*.

Zur Untersuchung des physiologischen Verhaltens der beiden *Micrococcus*-Arten wurden die gleichen Medien verwendet wie bei *Bacterium mannitolpœum* und *Bacterium gracile*. Im Nachstehenden sind die Versuchsergebnisse in der nämlichen Anordnung mitgeteilt, wie bei diesen und es wird daher, um Wiederholungen zu vermeiden, hinsichtlich der Beschaffenheit der Lösungen und der Versuchsanstellung, auf die entsprechenden Abschnitte bei *Bacterium mannitolpœum* verwiesen werden. Auch die *Micrococcus*-Arten wurden zuerst in künstlichen Nährlösungen geprüft. In der ersten, bestehend aus Äpfelsäure, Asparagin, Magnesiumsulfat und Dikaliumphosphat, Chlornatrium und Lävulose (p. 161), wuchsen sie nicht, wie dies auch bei den anderen beiden Bakterienarten der Fall war. Dagegen zeigten sie einige Entwicklung in der zweiten Lösung, zusammengesetzt aus Pepton, Dikaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Chlorcalcium, Lävulose und etwas Äpfelsäure. Die Veränderungen waren folgende:

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milchsäure g im l
Nährlösung 2, steril	0,47	0,11	0,68
„ 2 + <i>Micr. acidovorax</i>	0,67	0,18	1,44
„ 2 + <i>Micr. variococcus</i> h	0,30	0,13	1,00
Nährlösung 2 + 10 ⁰ / _∞ äpfelsaures Kalium, steril	0,47	0,19	0,54
„ 2 + 10 ⁰ / _∞ äpfelsaures Kalium + <i>Micr. acidovorax</i>	0,0 ¹⁾	0,27	2,70
„ 2 + 10 ⁰ / _∞ äpfelsaures Kalium + <i>Micr. variococcus</i> h	0,0 ²⁾	0,18	1,12

Die beiden *Micrococcus*-Arten vermochten in dieser künstlichen Nährlösung sowohl Lävulose als äpfelsaures Kalium, wenn auch in geringen Mengen, abzubauen. *Micrococcus acidovorax* erwies sich darin aber energischer als *Micrococcus variococcus* h. Wie aus der Zunahme des Milchsäuregehaltes hervorgeht, wurde in der Nährlösung 2 ohne äpfelsaures Kalium Lävulose zersetzt ohne Bildung von flüchtiger Säure, im Gegensatz zu *Bacterium mannitolpœum*, und *Bacterium gracile*, von denen das erstere in der gleichen Lösung verhältnismäßig viel, das letztere etwas weniger flüchtige Säure bildete. In der Lösung 2 mit äpfel-

¹⁾ Die Lösung war alkalisch und es bedurfte zur Neutralisation von 10 ccm = 0,9 ccm n/10 Schwefelsäure.

²⁾ Die Lösung war alkalisch und es bedurfte zur Neutralisation von 10 ccm = 0,4 ccm n/10 Schwefelsäure.

saurem Kalium vermochte *Micrococcus acidovorax* eine ziemlich starke Umsetzung zu verursachen und doch war die Bildung flüchtiger Säure sehr gering. Ob die Milchsäure nur aus der Lävulose entstanden ist oder aus äpfelsaurem Kalium, oder ob beide Substanzen angegriffen wurden, läßt sich hier ohne Zuckerbestimmung nicht nachweisen wie z. B. bei *Bacterium gracile*, das beim Abbau von äpfelsaurem Kalium ebenfalls keine nennenswerten Mengen flüchtiger Säure bildet, wohl aber bei der Zersetzung von Lävulose.

1. Verhalten des *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus h* gegenüber den Hexosen:
Dextrose, Lävulose und Galaktose.

Bezüglich der Versuchsanstellung kann auf das Kapitel *Bacterium manniopœum* (p. 162) verwiesen werden, da die Versuche zu gleicher Zeit mit den gleichen Lösungen, bei derselben Temperatur und während derselben Versuchsdauer durchgeführt wurden. In folgender Tabelle sind die Ergebnisse zusammengestellt:

Tabelle 44.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Alkohol	Mannit	Zucker als Invertzucker
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Hefeauszug I + Dextrose, steril . .	0,74	0,28	0,43	0,36	0,0 ¹⁾	— ¹⁾	19,48
„ I + „ + Micr. acidov.	5,82	0,51	5,26	5,28	0,0	0,0	11,65
„ I + „ + Micr. variococcus h	2,01	0,37	1,60	2,70	0,1	0,0	17,08
Hefeauszug II + Lävulose, steril . .	0,77	0,34	0,40	0,90	0,0	—	23,96
„ II + „ + Micr. acidov.	4,29	0,53	3,71	6,40	0,1	0,0	18,60
„ II + „ + Micr. variococcus h	1,27	0,46	0,76	2,24	0,0	0,0	22,48
Hefeauszug III + Galaktose, steril . .	0,47	0,27	0,17	0,68	—	—	ca. 20
„ III + Galaktose + Micr. acidov. (1)	3,89	0,48	3,36	5,26	—	—	—
„ (2)	3,08	0,48	2,55	3,96	0,4	—	—
Hefeauszug III + Galaktose + Micr. variococcus h (1)	1,00	0,46	0,49	1,66	—	—	—
„ (2)	1,27	0,49	0,73	1,56	0,0	—	—
Hefeauszug I ohne Zuckerzusatz, steril	0,74	0,28	0,43	0,36	—	—	—
Hefeauszug I ohne Zuckerzusatz + Micr. acidov.	1,10	0,40	0,66	1,12	—	—	—
Hefeauszug I ohne Zuckerzusatz + Micr. variococcus h	1,03	0,36	0,63	1,12	—	—	—
Hefeauszug III ohne Zuckerzusatz steril	0,67	0,27	0,37	0,68	—	—	—
Hefeauszug III ohne Zuckerzusatz + Micr. acidov.	0,87	0,31	0,53	1,34	—	—	—
Hefeauszug III ohne Zuckerzusatz + Micr. variococcus h	0,87	0,30	0,54	1,56	—	—	—

¹⁾ 0,0 bedeutet, daß von einer Substanz keine nachweisbaren Mengen gefunden wurden, — daß man die Bestimmung nicht ausführte.

Zweite Abt. Bd. 36.

16

Sowohl *Micrococcus acidovorax* als auch *Micrococcus variococcus* vermochte alle 3 Zuckerarten zu vergären und zwar der erstere in erheblich ausgiebigerer Weise. Obgleich bei allen 3 Zuckerarten ziemliche Mengen umgesetzt wurden, konnte doch keine Kohlensäureentwicklung beobachtet werden, während bei *Bacterium mannitopœum* und *Bacterium gracile* eine ziemliche Gasentwicklung sich einstellte. Auch bezüglich der Alkohol- und Mannitbildung unterscheiden sich die beiden *Micrococcus* von den ebengenannten *Bacterium*-Arten, indem sie aus Dextrose und Galaktose keinen Alkohol und aus Lävulose keinen Mannit bilden. Und ebenso tritt in der Bildung von flüchtiger Säure ein scharf unterscheidendes Merkmal zutage, indem *Bacterium mannitopœum* bis 3,5‰ und *Bacterium gracile* bis 2,8‰ flüchtige Säure zu erzeugen vermochten, *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* dagegen nur 0,2—0,3‰, so geringe Mengen, daß wir sie nicht als eigentliche Gärprodukte, sondern als sonstige Stoffwechselprodukte ansehen möchten.

Während wir bei *Bacterium mannitopœum* und *Bacterium gracile* neben der Milchsäure stets noch andere Gärprodukte auftreten sehen, wie Kohlensäure, Essigsäure und je nach der Zuckerart Alkohol oder Mannit, so beobachten wir bei unseren *Micrococcus*-Arten eine reine Milchsäuregärung, ohne Erzeugung nennenswerter Mengen der andern genannten Umsetzungsprodukte. Der Gärprozeß scheint hier nach der Formel: $C_6H_{12}O_6 = 2C_3H_6O_3$ zu verlaufen. Betrachten wir z. B. das Verhalten des *Micrococcus acidovorax* im Hefeauszug mit Lävulose, so steht der Zuckerabnahme um 5,36 g eine Milchsäurebildung von 5,5 g gegenüber, bei einer Bildung von nur 0,19 g flüchtiger Säure. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß ein kleiner Teil dieser Milchsäure aus der geringen zur Ansäuerung des Hefeauszuges benützten Menge Äpfelsäure entstehen kann, wogegen andererseits etwas vom verschwundenen Zucker zum Wachstum und den Stoffwechselvorgängen des *Micrococcus acidovorax* benützt worden sein wird. Weniger übereinstimmend ist die Menge der erzeugten Milchsäure mit der verschwundenen Zuckermenge bei der Dextrose. An Stelle von 7,83 g verschwundenem Zucker wurden nur 4,92 g Milchsäure gebildet. In allen Fällen wurde durch die *Micrococcus*-Arten der Gesamtsäuregehalt der Lösungen erhöht und zwar entsprechend der mehr oder weniger ausgiebigen Tätigkeit der Bakterien. Da jeweils nur wenig flüchtige Säure entstanden ist, war die Zunahme der Gesamtsäure durch die Bildung der Milchsäure bedingt.

Es dürfte am Platze sein, die von Seifert bei seinem *Micrococcus malolacticus* beobachteten Umsetzungen von Dextrose und Lävulose hier heranzuziehen. In einer Nährlösung mit 30‰ Dextrose konstatierte er nach Verlauf von 45 Tagen eine Zunahme der Gesamtsäure um 5,3‰, als Weinsäure (= 4,73‰ Äpfelsäure) und eine Zunahme von 1,23‰ flüchtiger Säure. In unseren Versuchen dagegen entstanden in der Versuchszeit von 40 Tagen bei einer Zunahme des Gesamtsäuregehaltes um 5,08‰ (als Äpfelsäure) nur 0,23‰ flüchtiger Säure. Nach Seiferts ausdrücklicher Angabe besteht die hierbei gebildete nicht flüchtige Säure weder aus Milchsäure noch aus Bernsteinsäure, dagegen vielleicht aus Glykonsäure oder Lävulinsäure. Es unterscheidet sich also der *Micrococcus malolacticus* auch hierin ganz wesentlich von den beiden von uns studierten *Micrococcus*-Arten. Ferner gibt Seifert an, daß sein

Micrococcus malolacticus in der Lävulose haltigen Lösung gar nicht gewachsen sei. Unsere beiden *Micrococcus* vermochten dagegen die Lävulose umzusetzen, der eine allerdings energischer als der andere.

Fassen wir das Gesagte zusammen, so ergibt sich, daß *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* h Dextrose, Lävulose und Galaktose umzusetzen vermögen unter fast ausschließlicher Bildung von Milchsäure. Die beiden *Micrococcus* erwiesen sich dabei als verschieden hinsichtlich der Gärungsenergie, indem *Micrococcus acidovorax* ein bedeutend kräftigeres Gärvermögen zeigt als *Micrococcus variococcus* h. Von *Micrococcus malolacticus* Seifert unterscheiden sie sich im Verhalten gegenüber der Dextrose und Lävulose ganz wesentlich.

2. Verhalten des *Micrococcus acidovorax* und des *Micrococcus variococcus* h gegenüber Saccharose, Laktose, Maltose und Raffinose.

Auch hier wurden die Zuckerarten nicht mit dem Hefeauszug zusammen, sondern für sich in reinen Lösungen sterilisiert und diese dann im abgekühlten Zustande dem sterilisierten Hefeauszug, der selbst, wie direkt nachgewiesen wurde, keinen Zucker enthielt, zugefügt. Um eine vollständige Sterilisation des Hefeauszuges zu erleichtern, wurde derselbe etwas angesäuert und zwar bei Raffinose mit Weinsäure, bei den übrigen Zuckerarten mit Äpfelsäure. Auch im übrigen war die Versuchsanstellung dieselbe wie bei den diesbezüglichen Versuchen mit *Bacterium mannitolpæum* und *Bacterium gracile*. Die bei 23° aufbewahrten Flüssigkeiten wurden nach 5 Wochen untersucht und lieferten folgendes Ergebnis:

Tabelle 45.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug IV + Saccharose, steril	0,47	0,34	0,10	0,56
„ IV + „ + <i>Micr. acidovorax</i> . . .	1,24	0,40	0,80	1,56
„ IV + „ + <i>Micr. variococcus</i> h . .	0,94	0,47	0,42	1,66
Hefeauszug IV + Laktose, steril	0,53	0,34	0,16	0,56
„ IV + „ + <i>Micr. acidovorax</i> . . .	1,87	0,41	1,42	3,02
„ IV + „ + <i>Micr. variococcus</i> h . .	0,47	0,34	0,10	1,34
Hefeauszug IV + Maltose, steril	0,53	0,34	0,16	0,56
„ IV + „ + <i>Micr. acidovorax</i> . . .	4,62	0,49	4,08	4,60
„ IV + „ + <i>Micr. variococcus</i> h . .	0,90	0,44	0,42	1,56
Hefeauszug V + Raffinose, steril	0,37	0,27	0,07	0,54
„ V + „ + <i>Micr. acidovorax</i> . . .	1,07	0,68	0,32	1,12
„ V + „ + <i>Micr. variococcus</i> h . .	1,00	0,52	0,43	1,12
Hefeauszug IV, ohne Zucker, steril	0,53	0,34	0,16	0,56
„ IV, „ „ + <i>Micr. acidovorax</i> . . .	0,87	0,43	0,40	1,46
„ IV, „ „ + <i>Micr. variococcus</i> h . .	0,63	0,35	0,25	1,21
Hefeauszug V, „ „ steril	0,46	0,27	0,16	0,54
„ V, „ „ + <i>Micr. acidovorax</i> . . .	1,07	0,48	0,54	0,78
„ V, „ „ + <i>Micr. variococcus</i> h . .	1,10	0,58	0,46	0,82

16*

Zur richtigen Beurteilung dieser Zahlen soll zunächst der Einfluß der Bakterien auf die Hefeauszüge ohne Zuckerzusatz festgestellt werden. In dem Hefeauszug IV hat der Milchsäuregehalt merklich zugenommen, sowohl in Gegenwart des *Micrococcus variococcus* h als auch bei Einwirkung des *Micrococcus acidovorax*. Hier ist offenbar die zur Ansäuerung benützte Äpfelsäure abgebaut worden und wahrscheinlich auch noch eine andere den Bakterien zugängliche Substanz des Hefeauszuges. Auf letzteres weist das Verhalten des Hefeauszuges V hin, denn die hier zur Ansäuerung benützte Weinsäure wird von den Mikrokokken nicht angegriffen und dennoch hat der Milchsäuregehalt um 0,2 g zugenommen. Diese Mikrokokken verhalten sich im übrigen in den Hefeauszügen ähnlich wie *Bacterium gracile*, das ebenfalls die Äpfelsäure abbaut, dagegen abweichend von *Bacterium mannitopectum*, das die Hefeauszüge ohne Zucker vollständig unverändert läßt, also weder die Äpfelsäure noch sonst eine Substanz desselben angreift.

Von den 4 Zuckerarten wurde die Maltose am besten vergoren und zwar nur von *Micrococcus acidovorax*. Neben etwa 4⁰/₁₀₀ Milchsäure wurden dabei nur Spuren von flüchtiger Säure erzeugt. *Micrococcus variococcus* h vermochte diesen Zucker ebensowenig wie *Bacterium gracile* anzugreifen; die beobachtete geringe Zunahme an Milchsäure ist auf die Umsetzung von Äpfelsäure usw. im Hefeauszug zurückzuführen. Bei der Vergleichung der Milchsäuregehalte ist übrigens noch zu berücksichtigen, daß die Bestimmung der Milchsäure durch die Anwesenheit gewisser Zuckerarten beeinflusst wird, in der Weise, daß man im gleichen Hefeauszug ohne Zuckerzusatz weniger Milchsäure findet, als nach dem Zuckerzusatz, ein Fehler der Methode, der nicht außer acht gelassen werden darf. (Man vergleiche in Tabelle 44 z. B. den Hefeauszug mit und ohne Lävulose ersterer = 0,90⁰/₁₀₀, letzterer 0,68⁰/₁₀₀ Milchsäure ergebend.) In der uns vorliegenden Tabelle 45 ist bei sämtlichen sterilen Hefeauszügen die Bestimmung des Milchsäuregehaltes vor dem Zuckerzusatz ausgeführt worden. Während beim *Bacterium mannitopectum* eine merkliche Alkoholbildung stattfand, ließen sich in dem Hefeauszug mit Maltose und *Micrococcus acidovorax* nur Spuren von solchen, 0,1⁰/₁₀₀ nachweisen; ebenso bei dem Auszug mit Laktose.

Auch die Laktose wurde von *Micrococcus acidovorax* noch ziemlich energisch angegriffen, wiederum unter fast ausschließlicher Bildung von Milchsäure; auf 2,46 g neugebildete Milchsäure kommen nur 0,07 g flüchtige Säure. — Ebenso wie *Bacterium mannitopectum* und *B. gracile* wurden auch unsere beiden Mikrokokken in sterilisierte Milch ausgesät. Sie vermochten bei 37° selbst während 5 Wochen diese aber nicht zum Gerinnen zu bringen; obgleich *Micrococcus acidovorax* Laktose angreift, so bildet er offenbar doch nicht genug Milchsäure, um das Gerinnen herbeizuführen.

Saccharose und Raffinose wurden weder durch *Micrococcus acidovorax* noch durch *Micrococcus variococcus* h vergoren.

Wie sehr *Micrococcus acidovorax*, der in den genannten Zuckerarten ja allein gediehen ist, sich von *Bacterium mannitopectum* unterscheidet, mag u. a. aus dem Verhalten der beiden Bakterien in Maltose hervorgehen.

Von den beiden *Micrococcus*-Arten vermag *Micrococcus acidovorax* Laktase und Maltase zu bilden und daher die

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milchsäure g im l	Alkohol g im l
<i>Bacterium mannitopœum</i> f	5,29	1,58	4,36	2,78
<i>Micrococcus acidovorax</i>	4,62	0,49	4,60	0,0

betreffenden Zuckerarten Laktose und Maltose anzugreifen. Als Umsetzungsprodukt erscheint auch hier wieder fast ausschließlich Milchsäure, neben welcher nur Spuren von flüchtiger Säure entstehen. Invertase und Raffinase werden von *M. acidovorax* dagegen nicht erzeugt. *Micrococcus variococcus* bildet keines dieser Enzyme, läßt also alle 4 Zuckerarten unberührt.

3. *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* gegenüber den Pentosen: l-Arabinose, Xylose und Rhamnose (Isodulcit).

Die Versuchsanstellung war die gleiche, wie bei *Bacterium mannitopœum* (p. 171) und der Versuch wurde bei der gleichen Temperatur von 23° und während derselben Zeit durchgeführt.

Tabelle 45.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug III + 12,5 ⁰ / ₁₀₀ Arabinose, steril	0,50	0,27	0,20	0,68
„ III + 12,5 ⁰ / ₁₀₀ „ + <i>Mic. acidovorax</i>	0,74	0,34	0,37	1,22
„ III + 12,5 ⁰ / ₁₀₀ „ + <i>Mic. variococcus</i> h	0,87	0,43	0,40	1,00
„ III ohne Arabinose, steril	0,67	0,27	0,37	0,68
„ III „ „ + <i>Mic. acidovorax</i>	0,87	0,31	0,53	1,34
„ III „ „ + <i>Mic. variococcus</i> h	0,87	0,30	0,54	1,56

Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß die l-Arabinose weder vom einen noch vom andern *Micrococcus* angegriffen wird. Dasselbe war nun auch der Fall bei den übrigen Pentosen, nämlich der Xylose und Rhamnose. Daß die Bakterien aber in den Hefeauszügen mit und ohne Pentosen ein wenig gewachsen sind, geht aus der direkten Beobachtung sowie auch aus der geringen Zunahme an Milchsäure hervor. Also auch durch ihr Verhalten gegenüber l-Arabinose und Xylose, worin sie mit *Bacterium gracile* übereinstimmen, unterscheiden sie sich scharf vom *Bacterium mannitopœum*.

Von den in den Gärungsgewerben in Betracht kommenden Mikrokokken ist *Pediococcus acidilactici* Lindner, der aus Biermaische gezüchtet wurde, der einzige wichtigere Milchsäurebildner. Nach Henneberg (1; p. 47) vermag derselbe Xylose umzusetzen, ebenso Arabinose.

4. Verhalten des *Micrococcus acidovorax* und des *Micrococcus variococcus h* gegenüber den Glukosiden: α -Methylglukosid, Amygdalin und Phloridzin.

Näheres über die Versuchsanstellung findet sich in dem betreffenden Kapitel der *Bacterium mannitopœum*-Gruppe (p. 173). Die Versuche wurden zu gleicher Zeit wie diejenigen mit *B. mannitopœum* und *B. gracile* und mit den nämlichen Lösungen durchgeführt. Versuchsdauer bei Methylglukosid und Amygdalin 35 Tage, bei Phloridzin 90 Tage. Eine zweite Untersuchung wurde vorgenommen bei Amygdalin nach 180 Tagen, bei Phloridzin nach 200 Tagen. Temperatur 23°.

Tabelle 46.

				Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug	III	+	α -Methylglukosid, steril	0,50	0,27	0,20	0,68
"	III	+	" + <i>Micr. acidovorax</i>	0,94	0,34	0,57	1,44
"	III	+	" + <i>Micr. variococcus h</i>	1,27	0,51	0,71	1,80
Hefeauszug	VII	+	Amygdalin, steril	0,73	0,36	0,33	0,61
"	VII	+	" + <i>Micr. acidovorax</i> (1)	0,87	0,30	0,54	0,36
"	VII	+	" + <i>Micr. acidovorax</i> (2)	0,67	0,39	0,24	0,50
"	VII	+	" + <i>Micr. variococcus h</i> (1)	2,41	0,64	1,71	2,84
"	VII	+	" + <i>Micr. variococcus h</i> (2)	2,28	0,72	1,49	2,92
Hefeauszug	III	(ohne	Glukosid), steril	0,67	0,27	0,37	0,68
"	III	"	" + <i>Micr. acidovorax</i>	0,87	0,31	0,53	1,34
"	III	"	" + <i>Micr. variococcus h</i>	0,87	0,30	0,54	1,56

Das Phloridzin wurde durch keinen der beiden Mikrokokken angegriffen, trotz der langen Versuchsdauer von 200 Tagen. Wir haben daher die betreffenden analytischen Ergebnisse nicht in die Tabelle aufgenommen. Das α -Methylglukosid wurde von *Micrococcus acidovorax* offenbar ganz unberührt gelassen, denn der Gehalt an Gesamtsäure und Milchsäure hat nur jene Veränderungen erlitten, wie sie auch im Hefeauszug ohne α -Methylglukosid auftraten. Dagegen glauben wir aus dem Verhalten des *Micrococcus variococcus h* schließen zu dürfen, daß dieser Organismus das α -Methylglukosid etwas zu vergären vermochte.

Besonderes Interesse bietet das Verhalten der beiden Mikrokokken gegenüber Amygdalin. Der sonst energischer wirkende *Micrococcus acidovorax* versagte dieser Substanz gegenüber vollständig, selbst bei der längeren Versuchsdauer (2) von 180 Tagen, während der *Micrococcus*

variococcus h dieselbe schon im Laufe von 35 Tagen ziemlich weit gehend umzusetzen vermochte. Bei längerem Zuwarten fand dann keine weitere Umsetzung mehr statt (2). Die hier festgestellte Eigenschaft des genannten *Micrococcus* möchten wir ganz besonders hervorheben. Sie offenbart sich schon ohne chemische Untersuchung durch den charakteristischen intensiven Geruch der Versuchsflüssigkeit nach Bittermandelöl, was auf die Bildung von Emulsin oder eines emulsinähnlichen Enzyms hindeutet. Auch möge darauf hingewiesen sein, daß die so veränderte Flüssigkeit nach dem Öffnen der Flaschen auf die Dauer steril blieb. Andere Organismen vermögen also darin nicht zu wachsen und wenn der *Micrococcus variococcus h* eine so weitgehende Zersetzung hervorzurufen vermochte, so beweist dies, daß er an die giftigen Umsetzungsprodukte angepaßt ist. Die bei der Spaltung des Glukosides freiwerdende Glukose wurde hier in ähnlicher Weise zersetzt wie in den reinen Glukoselösungen, d. h. unter Bildung von Milchsäure und wenig flüchtiger Säure. Ganz anders wirkte im Vergleich dazu *Bacterium mannitopœum*, bei dessen Glukosezersetzung neben Milchsäure stets viel flüchtige Säure entsteht, wie nachfolgende Zusammenstellung zeigt:

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milchsäure g im l
Amygdalin, zersetzt durch <i>Mic. variococcus h</i>	2,28	0,72	2,92
Amygdalin, zersetzt durch <i>Bacterium mannitopœum</i>	3,68	2,32	2,62

Die beiden Bakterien sind übrigens nicht im gleichen Maße befähigt, das Amygdalin anzugreifen; der *Micrococcus variococcus h* ist dem *Bacterium mannitopœum* überlegen, indem die Umsetzung schon nach 35 Tagen vollendet war, zu einer Zeit, da das *Bacterium mannitopœum* noch kaum eine Veränderung erzielt hatte. — Da bei der Verarbeitung von Kirschen zu Kirschbranntwein die Kirschsteine oft absichtlich zerschlagen oder zermalmt werden, so können gewisse Mengen Amygdalin durch unseren *Micrococcus variococcus* oder durch *Bacterium mannitopœum* zur Gärung gelangen, ebenso bei Äpfelsaft, bei dessen Gewinnung die Apfelkerne häufig, wenn auch unabsichtlich, zerquetscht werden. Ob bei diesen Gärvorgängen dann solche Quantitäten von Bittermandelöl und Blausäure entstehen, die gesundheits-schädlich wirken könnten, möchten wir vorläufig dahingestellt sein lassen.

Micrococcus acidovorax vermag keines der 3 Glukoside anzugreifen. *Micrococcus variococcus h* kann Amygdalin kräftig vergären, unter Bildung von Milchsäure, wenig flüchtiger Säure, Bittermandelöl usw., auch α -Methylglukosid wird von diesem *Micrococcus* etwas vergoren, Phloridzin dagegen nicht.

5. *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* h in Lösungen von Mannit, Dextrin und Pepton Witte.

In der gleichen Weise, wie bei *Bacterium mannitopæum* (p. 175) beschrieben wurde, führten wir auch Versuche mit den 2 *Micrococcus*-Arten und den 3 genannten Substanzen durch.

Es zeigte sich aber, daß weder beim Mannit, noch in den Lösungen von Dextrin oder Pepton Witte nachweisbar Umsetzungen stattfanden und deshalb verzichteten wir darauf, die Einzelresultate der diesbezüglichen Untersuchung hier ausführlich wiederzugeben.

6. Verhalten des *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* h gegenüber Äpfelsäure und äpfelsauren Salzen.

Bezüglich der Versuchsanstellung sei auf die gleichartigen Versuche mit *Bacterium mannitopæum* verwiesen. Die Versuchsdauer bis zur ersten Untersuchung der Proben betrug beim äpfelsauren Äthyl 13 Wochen, bei allen übrigen 5—6 Wochen. Versuchstemperatur 23°.

In sämtlichen Nährlösungen entwickelten sich die Mikrokokken gut. Schon innert der ersten Woche waren starke Trübungen und ziemlich lebhaft Gasentwicklung zu beobachten. Letztere trat besonders stark in dem Hefeauszug mit saurem äpfelsaurem Calcium hervor. Sowohl die freie Äpfelsäure als auch die gebundene in allen verwendeten Salzen wurde durch die beiden *Micrococcus*-Arten angegriffen. Bei der freien Äpfelsäure war zu beobachten, daß der Abbau fast unter ausschließlicher Bildung von Milchsäure und Kohlensäure stattfand. Die Bildung von flüchtiger Säure ließ sich nicht nachweisen (Tab. 47). Will man berechnen, wieviel Proz. Milchsäure aus der anfänglich vorhandenen Äpfelsäure gebildet wurde, so ist zu berücksichtigen, daß z. B. bei *Micrococcus acidovorax* von der neu entstandenen Milchsäure 3,28 g noch diejenige Menge Milchsäure (ca. 0,2 g) abzuzählen ist, die aus unbekannten Stoffen des Hefeauszuges durch den *Micrococcus acidovorax* nachweisbar erzeugt werden kann (p. 244). Es bleiben dann 3,08 g wirklich gebildete Milchsäure, was 65,6 Proz. der ursprünglich vorhandenen Äpfelsäure entspricht. Diese Äpfelsäure wurde alle abgebaut und zwar ohne Bildung von anderen Produkten, daher die hohe Ausbeute an Milchsäure, die ziemlich der aus der Formel sich ergebenden Menge von 67 Proz. gleichkommt. Ein nahezu gleiches Resultat ergäbe eine solche Berechnung für *Micrococcus variococcus* h in der Lösung mit 4,69 Proz. Äpfelsäure.

Auffällig mögen auf den ersten Blick die Ergebnisse bei dem neutralen äpfelsauren Kalium erscheinen. Doch handelt es sich auch hier um einen Abbau der Äpfelsäure. Die ca. 10⁰/_∞ zugesetztes äpfelsaures Kalium enthalten ca. 6,3 g Äpfelsäure; dazu kommen noch 0,37 g dem Hefeauszug zugefügte Äpfelsäure = 6,67 g, die nach der Formel 4,4 g Milchsäure liefern könnten. Die neu entstandene Milchsäure erreicht nun ungefähr diesen Betrag, woraus hervorgeht, daß das äpfelsaure Kalium vollständig zersetzt und die Äpfelsäure unter Bildung von Milchsäure glatt zerlegt wurde. Die bei diesem Vorgange frei werdenden Kalium-Ionen finden sich zur Hälfte an die Milchsäure gebunden, während die übrigen zum größten Teil frei wurden und die alkalische Reaktion der Nährflüssigkeit zur Folge haben. Etwas weniger

vollständig wurde das äpfelsaure Kalium durch den *Micrococcus variococcus* h umgesetzt. Schon bei den Zuckerarten hat sich gezeigt, daß dieser *Micrococcus* etwas weniger energisch wirkt als der *Micrococcus acidovorax*. Ein zweiter mit einem anderen Hefeauszug (IX) und zu anderer Zeit durchgeführter Versuch mit äpfelsaurem Kalium bestätigte die beim ersten erzielten Ergebnisse vollständig.

Tabelle 47.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug VIII mit 2,27% Äpfelsäure, steril	2,27	0,43	1,80	0,54
„ VIII „ 2,27% „ + <i>Micr. acidov.</i>	1,74	0,38	1,32	2,25
„ VIII „ 2,27% „ + <i>Micr. varioc. h</i>	1,67	0,43	1,20	2,16
Hefeauszug VIII mit 4,69 ⁰ / ₁₀₀ Äpfelsäure, steril	4,69	0,43	4,22	0,54
„ VIII „ 4,69 ⁰ / ₁₀₀ „ + <i>Micr. acidov.</i>				
8. IV. 11	2,94	0,46	2,43	3,82
„ VIII „ 4,69 ⁰ / ₁₀₀ „ + <i>Micr. acidov.</i>				
8. I. 12	3,05	—	—	—
„ VIII „ 4,69 ⁰ / ₁₀₀ „ + <i>Micr. varioc. h.</i>				
8. IV. 11.	3,01	0,43	2,54	3,74
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Kalium, steril	0,37	0,27	0,07	0,68
„ III „ 10 ⁰ / ₁₀₀ „ „ + <i>Micr. acidov.</i>	0,0 ¹⁾	0,24	—	4,82
„ III „ 10 ⁰ / ₁₀₀ „ „ + <i>Micr. varioc. h</i>	0,0 ²⁾	0,24	—	3,60
Hefeauszug IX mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Kalium, steril	1,07	0,39	0,64	0,56
„ IX „ 10 ⁰ / ₁₀₀ „ „ + <i>Micr. acidov.</i>	0,0 ³⁾	0,40	—	4,88
„ IX „ 10 ⁰ / ₁₀₀ „ „ + <i>Micr. varioc. h</i>	0,0 ⁴⁾	0,36	—	3,76
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Ammon., steril	1,34	0,0 ⁵⁾	—	0,44
„ III „ „ „ „ + <i>Micr. acidov.</i>	0,0 ⁶⁾	0,0 ⁷⁾	—	1,90
„ III „ „ „ „ + <i>Micr. varioc. h</i>	0,0 ⁸⁾	0,0 ⁹⁾	—	1,90
Hefeauszug III mit 10 ⁰ / ₁₀₀ saur. äpfels. Calcium, steril	3,55	0,27	3,25	0,68
„ III „ „ „ „ + <i>Micr. acidov.</i>	1,34	0,38	0,92	5,16
„ III „ „ „ „ + <i>Micr. varioc. h</i>	1,14	0,37	0,74	5,16
Hefeauszug V mit 10 ⁰ / ₁₀₀ äpfels. Äthyl, steril	1,23	0,27	0,93	0,54
„ V „ „ „ „ + <i>Micr. acidov.</i>				
(29. VIII)	1,87	0,57	1,24	2,46
„ V „ „ „ „ + <i>Micr. acidov.</i>				
(12. I. 12)	2,37	0,56	1,75	2,40
„ V „ „ „ „ + <i>Micr. varioc. h</i>				
(29. VIII.)	1,94	0,61	1,27	2,24
„ V „ „ „ „ + <i>Micr. varioc. h</i>				
(12. I. 12)	2,21	0,60	1,55	2,34

Verschiedene Versuchsflüssigkeiten reagierten alkalisch; der Säuregehalt wurde dann jeweils als 0,0 angeführt. Sie bedurften zur Neutralisation von 10 ccm folgende Mengen ¹/₁₀ Normalschwefelsäure ¹⁾ 1,9, ²⁾ 1,0, ³⁾ 1,6, ⁴⁾ 1,1, ⁵⁾ 1,9, ⁶⁾ 1,8. Beim äpfelsauren Ammonium reagierten die Destillate alkalisch, es bedurfte zur Neutralisation der Destillate von je 50 ccm Kulturflüssigkeit folgende Mengen ¹/₁₀ Normalschwefelsäure, bei ⁵⁾ 4,2, ⁷⁾ 14,4, ⁹⁾ 12,4.

Das äpfelsaure Ammonium wurde nicht so stark abgebaut wie das äpfelsaure Kalium. Es ist dies vielleicht dadurch zu erklären, daß sich schon frühe in der Kulturflüssigkeit Ammoniak befindet und dieses auf die Lebenstätigkeit der Bakterien ungünstiger einwirkt als Kali.

Nach der Menge der neugebildeten Milchsäure zu urteilen ist in dem Hefe-

auszug mit saurem äpfelsaurem Calcium am meisten Äpfelsäure abgebaut worden. Es stand hier auch die größte Menge zur Verfügung, doch wurde nicht alles äpfelsaure Calcium umgesetzt, wie man aus der Menge der neugebildeten Milchsäure und derjenigen der ursprünglich vorhandenen Äpfelsäure schließen kann. Bei Feststellung der letzteren ist zu den ca. 7 g im sauren äpfelsauren Calcium noch die dem Hefeauszug zugefügte freie Äpfelsäure zu rechnen (ca. 0,37 g). Der neu entstandenen Milchsäure würden aber nur etwa 6,6 g Äpfelsäure entsprechen. Es ist also immerhin der weit- aus größere Teil der Äpfelsäure umgesetzt worden. Die Milchsäure ist fast ganz an das frei gewordene Calcium gebunden. Wäre nur das äpfelsaure Calcium abgebaut worden, dann müßte alle Milchsäure sich in gebundenem Zustande finden. Daß dies nicht der Fall ist, beweist ebenfalls, daß auch freie Äpfelsäure vergoren wurde und noch ein kleiner Teil des Salzes unzer- setzt blieb. In diesem Medium hat sich *Micrococcus variococ- cus h* nicht weniger energisch erwiesen als *Micrococcus acido- vorax*. Er hat das saure äpfelsaure Calcium ebenso weitgehend umgesetzt wie letzterer.

Auch das äpfelsaure Äthyl wurde von beiden Mikrokokken in gleicher Weise abgebaut. Sie vermochten aber offenbar diese Verbin- dung nicht in so leichter Weise zu zerlegen wie die vorangehend besproche- nen. Der neugebildeten Milchsäure (ca. 2 g) würden nur etwa 2,9 g abgebaute Äpfelsäure entsprechen. Auch die größere Produktion von flüchtiger Säure weist darauf hin, daß man es hier nicht mit einer reinen Milchsäuregärung zu tun hat wie bei der freien Äpfelsäure, beim äpfelsauren Kalium usw.

Nach der Abhandlung von Seifert (2; p. 10 ff.) zeigt sein *Micro- coccus malolacticus* gegenüber Äpfelsäure und saurem äpfelsaurem Kalium ein gleiches Verhalten wie unsere beiden Mikrokokken, also ziemlich glatten Abbau der Äpfelsäure in Kohlensäure, Milchsäure und wenig Essig- säure, wobei allerdings hinzugefügt werden muß, daß er seine Versuche nicht mit dem reingezüchteten Organismus, sondern mit Weintrub, der diesen enthielt, ausführte.

Von den beiden Bakterien, die wir in Abschnitt I und II einer eingehenden Untersuchung unterzogen haben, zeigt das *Bacterium gracile* in seinem Verhalten gegenüber Äpfelsäure und äpfelsauren Salzen eine gewisse Übereinstimmung mit den *Micrococcus*-Arten. Es hat ebenfalls die Äpfel- säure glatt zerlegt, dabei aber etwas mehr flüchtige Säure gebildet. Ganz anders verhielt sich *Bacterium mannitopœum*, das Äpfelsäure erst im Laufe langer Zeit zu vergären imstande ist, das neutrale äpfelsaure Kalium und das äpfelsaure Ammonium gar nicht anzugreifen vermag und auch das saure äpfelsaure Calcium und äpfelsaure Äthyl in geringerem Maße als die Vertreter der übrigen Gruppen zersetzt. Bezüglich der flüchtigen Säure verhielt es sich eher wie *Bacterium gracile*.

Micrococcus acidovorax und *Micrococcus variococcus h* besitzen eine ausgesprochene Fähigkeit, die Äpfelsäure in freier Form, sowie in folgenden Verbindungen: neutrales äpfelsaures Kalium, äpfelsaures Ammonium, saures äpfel- saures Calcium und zum Teil äpfelsaures Äthyl in glatter Weise abzubauen in Milchsäure und Kohlensäure.

Da in Obst- und Traubensäften und noch nicht fertig vergorenen Weinen die Bakterien neben der Äpfelsäure auch Zucker antreffen, so schien es uns von Interesse, einen unserer Organismen, *Micrococcus acido-*

vorax, auf sein Verhalten gegenüber Äpfelsäure, z. B. in Gegenwart von Lävulose, zu prüfen.

Weil das Verhalten bei verschiedenem Säuregrad ungleich sein könnte, wurden Hefeauszüge mit abweichendem Gehalt an Äpfelsäure hergestellt. Dem ersten fügte man nur ca. 1⁰/₁₀₀ Äpfelsäure zur Ansäuerung zu. Die übrigen erhielten so viel Äpfelsäure, daß sie bei der Bestimmung die in der Tabelle 48 angegebenen Gehalte aufwiesen. Außerdem verfuhr man so, daß je ein Hefeauszug mit demselben Säuregehalt mit und ohne Lävulose mit den Bakterien infiziert werden konnte. Die während 17 Tagen bei 23° eingetretenen Vorgänge sind aus folgender Tabelle zu ersehen. Bei dem Hefeauszug mit 7,4⁰/₁₀₀ Äpfelsäure fand noch eine 2. Untersuchung am 50. Versuchstage statt.

Tabelle 48.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milch- säure g im l	Zucker als Invertz. g im l
Hefeauszug + ca. 1 ⁰ / ₁₀₀ Äpfels. ohne Lävulose, steril	0,87	0,22	0,63	0,54	0,0
„ „ „ mit „ steril	0,87	0,22	0,63	0,76	12,27
„ „ „ ohne „ + Micr. acidov.	0,87	0,35	0,48	1,56	—
Hefeauszug + 2,21 ⁰ / ₁₀₀ Äpfels. + Lävulose, steril .	2,21	0,33	1,85	0,76	12,27
„ „ „ ohne „ + Micr.acidov.	1,74	0,26	1,45	2,46	—
„ „ „ mit „ + Micr.acidov.	4,28	0,38	3,86	5,40	8,30
Hefeauszug + 5,36 ⁰ / ₁₀₀ Äpfels. + Lävulose, steril . .	5,36	0,22	5,12	0,76	12,27
„ „ „ ohne „ + Micr.acidov.	3,21	0,31	2,87	4,04	—
„ „ „ mit „ + Micr.acidov.	4,55	0,35	4,16	5,50	10,35
Hefeauszug + 7,43 ⁰ / ₁₀₀ Äpfels. + Lävulose, steril . .	7,43	0,22	7,19	0,76	12,27
„ „ „ ohne „ + Micr.acidov. (4. II.) .	6,36	0,36	5,96	1,40	—
„ „ „ ohne „ + Micr.acidov. (8. III.) .	4,28	0,45	3,78	5,66	—
„ „ „ mit „ + Micr.acidov. (4. II.) .	4,89	0,30	4,56	3,36	12,21
„ „ „ mit „ + Micr.acidov. (8. III.) .	5,49	0,44	5,01	7,20	9,81

Die Bakterien wuchsen in allen diesen Hefeauszügen, jedoch verschieden rasch; beim Hefeauszug mit nur 0,87⁰/₁₀₀ Äpfelsäure zeigten sich zuerst Bakterientrübung und Gasentwicklung; die Gärung war schon in 8 Tagen vollendet. Auch bei 2,2⁰/₁₀₀ Äpfelsäure trat bald Trübung und Gasentwicklung ein, etwas rascher da, wo Lävulose vorhanden war. Merkwürdig lang-samer zeigte sich die Bakterienentwicklung bei 5,36⁰/₁₀₀ Äpfelsäure und am spätesten trübten sich die Flüssigkeiten mit 7,4⁰/₁₀₀ Äpfelsäure, so daß dieselben zur Zeit, da die anderen untersucht wurden, nur eine schwache Veränderung erlitten hatten. Besonders bei diesem Hefeauszuge zeigte sich der durch die Lävulose ausgeübte wachstumsfördernde Einfluß auf die Bakterien.

In den abgesetzten Bakteriendepots ließen sich mit bloßem Auge kleine Körnchen unterscheiden, die sich bei mikroskopischer Betrachtung als Konglomerate von Zoogloeen erwiesen. Es mag dies um so mehr Erwähnung

finden, weil Zoogloeen unserer Bakterien sonst häufig in Obst- und Traubensäften oder in Weinen, selten aber in Hefeauszügen entstehen.

Die Umsetzungen, welche *Micrococcus acidovorax* in dem schwach angesäuerten Hefeauszug ohne Lävulose verursachte, sind uns bekannt und geben keinen Anlaß zu weiteren Auseinandersetzungen. Im Hefeauszug mit $2,21\text{‰}$ Äpfelsäure ohne Lävulose zeigt der Milchsäuregehalt, daß die ursprünglich vorhandene Äpfelsäure vollständig verschwunden ist. Da, wo Lävulose vorhanden war, ist auch von dieser ein Teil umgesetzt worden, was aus der großen Menge Milchsäure hervorgeht und zudem durch die Zuckerbestimmung bestätigt wurde. Es läßt sich nun annähernd berechnen, daß hier der *Micrococcus* die Äpfelsäure nicht vollständig vergoren hatte, sondern daß noch ein kleiner Rest der letzteren übrigblieb. Die $5,4 - 0,76 = 4,64$ g Milchsäure ergeben, in Äpfelsäure umgerechnet 3,45 g; da die Gesamtsäure 4,28 beträgt, so muß demnach außer der Milchsäure, auch wenn diese in freier Form sich befindet, noch etwas unzersetzte Äpfelsäure vorhanden sein. Es ist also hier Äpfelsäure und Lävulose abgebaut worden.

Auch bei dem Hefeauszug mit $5,36\text{‰}$ Äpfelsäure ohne Lävulose wurde in der kurzen Versuchszeit die Äpfelsäure so gut wie vollständig abgebaut. Da, wo Lävulose vorhanden war, wurde auch diese etwas umgesetzt, doch nur halb so stark als in der vorhin erwähnten Lösung mit $2,21\text{‰}$ Äpfelsäure. Bei Gegenwart von Lävulose ist aber wiederum die Äpfelsäure nicht vollständig zersetzt worden, sondern ein allerdings kleiner Teil derselben übrig geblieben. Ob in diesem Falle beide Umsetzungen gleichzeitig vor sich gingen oder aber diejenige der Äpfelsäure vor derjenigen der Lävulose, läßt sich auf Grund des Versuches nicht feststellen.

Wie schon die Trübung und Gasentwicklung erkennen ließen, entwickelten sich die Bakterien in dem Hefeauszug mit $7,43\text{‰}$ Äpfelsäure nur langsam. Der hohe Äpfelsäuregehalt hat sichtlich hemmend eingewirkt. Am 19. Tag, als die anderen Lösungen untersucht wurden, war die Umsetzung hier noch eine verhältnismäßig geringe. In der Lösung ohne Lävulose waren nur 1,4, in derjenigen mit Lävulose $3,36\text{‰}$ Milchsäure vorhanden. Eine 30 Tage später durchgeführte Untersuchung ergab dann aber einen beträchtlich stärkeren Abbau von Säure und Zucker. Hier, wo der Vorgang in 2 Terminen beobachtet wurde, tritt deutlich zutage, daß doch zuerst die Äpfelsäure und erst nachher die Lävulose angegriffen wird. Bis zum 1. Termin zeigte sich zunächst der wachstumsfördernde Einfluß der Lävulose, obwohl bis dahin nur wenig von dieser Substanz verbraucht wurde. Diese letztere muß sich jedenfalls als Baustoff für die Bakterien eignen und so das Wachstum derselben fördern, wozu natürlich geringe Mengen genügen. Zur Milchsäurebildung ist bis dahin keine Lävulose verwendet worden. Die erst gebildeten $3,36 - 0,76 = 2,60$ g sind also ausschließlich aus Äpfelsäure entstanden. In der 2. Periode hat sich dann an der Milchsäuregärung nicht nur die Äpfelsäure, sondern auch die Lävulose beteiligt, da letztere während dieser Zeit eine Abnahme von ca. 2,4 g zeigte. Auch die Menge der neu entstandenen Milchsäure läßt hierauf schließen. Andererseits kann man aber auch erkennen, daß die Äpfelsäure nicht bis auf den letzten Rest umgesetzt wurde, denn der schließliche Gehalt an Gesamtsäure ist zu hoch, um durch den Milchsäuregehalt allein erklärt werden zu können.

Findet sich in Hefeauszügen neben Äpfelsäure auch Lävulose, so begünstigt letztere zwar das Wachstum von

Micrococcus acidovorax; zur Vergärung bevorzugen die Bakterien aber die Äpfelsäure, so daß anfänglich diese stärker abgebaut wird.

7. *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* h gegenüber Weinsäure und weinsauren Salzen.

Um das Verhalten gegenüber diesen Substanzen zu prüfen, wurden die gleichen Hefeauszüge wie bei *Bacterium mannitolopæum* verwendet (p. 179). Man fügte auch die gleichen Mengen von Weinsäure und deren Salzen zu, nämlich 2,32⁰/₁₀₀ und 5,02⁰/₁₀₀ Weinsäure, 10⁰/₁₀₀ und 15⁰/₁₀₀ saures weinsaures Kalium, 10⁰/₁₀₀ neutrales weinsaures Kalium und 10⁰/₁₀₀ neutrales weinsaures Ammonium. Die übrigen Versuchsbedingungen, Temperatur und Versuchsdauer waren dieselben.

Auch *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* vermochten nicht die Weinsäure und ihre zum Versuch verwendeten Salze anzugreifen. Allerdings konnte letzterer Organismus in den Versuchsflüssigkeiten eine kleine Steigerung der Milchsäureproduktion herbeiführen, allein er besitzt, wie wir schon früher dargetan haben, die Fähigkeit, eine nicht näher bestimmte Substanz des Hefeauszuges umzusetzen, was den übrigen beschriebenen Bakterien (*Bact. mannitolopæum* und *Bact. gracile*) abgeht.

Bei einem Versuch mit Rotwein aus Spätburgunder, den wir noch mitteilen werden, erhielt der letztere durch die Einwirkung von *Micrococcus acidovorax* das Aussehen eines umgeschlagenen Weines. Da nun, namentlich nach französischen Autoren, beim Umschlagen der Weine Weinstein zersetzt werden soll, so schien es geboten, gerade den eben erwähnten Organismus noch einläßlicher in dieser Richtung zu erforschen. Im vorangehend erwähnten Versuch hat *Micrococcus acidovorax* den Weinstein nicht angegriffen. Es wäre nun denkbar, daß die Bedingungen für seine Entwicklung zu ungünstig waren und daß das Ergebnis etwas anders ausfallen würde, wenn man dem *Micrococcus* durch eine geeignete Nährsubstanz das Wachstum sicherte. Es kam daher noch ein ähnlicher Versuch zur Durchführung wie er schon bei *Bacterium gracile* (p. 213) beschrieben wurde, wobei den mit 1⁰/₁₀₀ Äpfelsäure angesäuerten Hefeauszügen entweder nur 15⁰/₁₀₀ Weinstein oder aber 10⁰/₁₀₀ neutrales äpfelsaures Kalium oder endlich 15⁰/₁₀₀ Weinstein und 10⁰/₁₀₀ neutrales äpfelsaures Kalium zugesetzt wurden. Versuchsdauer 5 Wochen. Temperatur 23°. Bei diesem Versuch wurde auch gleichzeitig das Verhalten von *Micrococcus variococcus* h in dieser Richtung geprüft.

Aus den ersten Zeilen der Tabelle 49 geht, in Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Versuch, hervor, daß die beiden *Micrococcus* den Weinstein nicht umsetzen. Der beobachtete Rückgang der Gesamtsäure und die geringe Milchsäurebildung ist der zur Ansäuerung des Hefeauszuges benutzten Äpfelsäure zuzuschreiben.

In der 2. Versuchsreihe ergab sich das erwartete Resultat, daß die Äpfelsäure des äpfelsauren Kaliums durch die beiden *Micrococcus*-Arten energisch abgebaut wurde und zwar wieder von *Micrococcus variococcus* h nicht ganz vollständig.

Tabelle 49.

	Gesamt-säure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure
	g im l	g im l	g im l	g im l
Hefeauszug IX mit 15 ⁰ / ₁₀₀ Weinstein, steril	3,22	0,39	2,79	0,56
" IX " " " + Micr. acidov.	2,58	0,44	2,10	1,17
" IX " " " + Micr. varioc. h	2,48	0,52	1,91	1,16
Hefeauszug IX mit 10 ⁰ / ₁₀₀ neutr. äpfels. Kalium, steril	1,07	0,39	0,64	0,56
" IX " " " " + Micr. acidov.	0,0 ¹)	0,40	—	4,88
" IX " " " " + Micr. varioc. h	0,0 ²)	0,36	—	3,76
Hefeauszug IX mit 10 ⁰ / ₁₀₀ neutr. äpfels. Kalium + 15 ⁰ / ₁₀₀ Weinstein, steril	3,18	0,39	2,75	0,56
Hefeauszug IX mit 10 ⁰ / ₁₀₀ neutr. äpfels. Kalium + 15 ⁰ / ₁₀₀ Weinstein, + Micr. acidov.	1,14	0,44	0,66	4,60
Hefeauszug IX mit 10 ⁰ / ₁₀₀ neutr. äpfels. Kalium + 15 ⁰ / ₁₀₀ Weinstein, + Micr. varioc. h	1,27	0,44	0,79	4,60

Die Lösung mit neutralem äpfelsaurem Kalium zeigte nach Einwirkung der Bakterien alkalische Reaktion. Zur Neutralisation bedurfte es pro 10 ccm Lösung bei 1) 1,6, bei 2) 1,1 ccm $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure.

Das Hauptinteresse konzentriert sich auf die 3. Reihe, wo die beiden Salze vereinigt waren. Der Umstand, daß hier nicht mehr Milchsäure entstand, als da, wo das äpfelsaure Kalium allein vorhanden war, weist darauf hin, daß auch hier nur dieses letztere Salz abgebaut wurde. Hier hat auch der gewöhnlich etwas schwächer wirkende *Micrococcus variococcus* die Äpfelsäure des äpfelsauren Kaliums vollständig umgesetzt. Die Verhältnisse waren also hier für ihn günstiger und zwar wahrscheinlich deswegen, weil die Lösung nicht alkalisch wurde, was er, wie es scheint, weniger zu ertragen vermag als *Micrococcus acidovorax*.

In der 2. Versuchsreihe wurden die Hefeauszüge durch das beim Abbau der Äpfelsäure freiwerdende Kalium neutralisiert und schließlich alkalisch gemacht, denn von den Kalium-Ionen des neutralen äpfelsauren Kaliums wird nur die Hälfte durch die neu gebildete Milchsäure gebunden. In der 3. Versuchsreihe findet natürlich das gleiche statt; doch ist hier noch saures weinsaures Kalium vorhanden, an das die freiwerdenden Kalium-Ionen treten können. Ein Teil des Weinsteins wird also in neutrales weinsaures Kalium umgewandelt, das leichter löslich ist als Weinstein. Es kann also bei diesem Vorgang etwas Weinstein verschwinden, ohne daß wirklich Weinsäure abgebaut wurde. An den in den Lösungen ausgeschiedenen Weinsteinkristallen konnte bei der makroskopischen Beobachtung ein Auflösungsprozeß bzw. eine Größenabnahme oder dergleichen nicht beobachtet werden.

Nach französischen Forschern, z. B. Duclaux, ist, wie bereits erwähnt, das Umschlagen der Weine (maladie de la tourne) eine Vergärung des Weinsteins unter Bildung von Kohlensäure, Essigsäure und Propionsäure.

Bei unserem eben mitgeteilten Versuche kann aus dem Nichtverschwinden des Weinsteins sowohl, als auch aus dem Umstande, daß keine flüchtige Säure gebildet wurde, geschlossen werden, daß von einer solchen Weinsteingärung durch die beiden *Micrococcus*-Arten keine Rede

sein kann, obgleich ihnen eine kräftigere Entwicklung ermöglicht wurde. Dasselbe haben wir schon für *Bacterium mannitopœum* und *Bacterium gracile* nachgewiesen.

8. *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus h* in Lösungen von Bernsteinsäure, Zitronensäure und Milchsäure.

Wir haben schon nachgewiesen, daß sowohl das *Bacterium mannitopœum* (p. 180) als auch *Bacterium gracile* (p. 214) Bernsteinsäure und Milchsäure nicht anzugreifen vermögen. Bei der gleichen Versuchsanstellung, gleich beschaffenen Lösungen, der nämlichen Versuchsdauer, Temperatur usw. wurde nun auch festgestellt, daß unsere *Micrococcus*-Arten diese beiden Säuren ebenfalls nicht abbauen. Anders verhielten sich *Bacterium gracile* und *Bacterium mannitopœum* gegenüber der Zitronensäure, die von beiden Organismen unter Bildung von Kohlensäure und Essigsäure zerlegt wird, vom ersteren allerdings leichter. Da die *Micrococcus*-Arten in manchen Umsetzungen Übereinstimmung mit *Bacterium gracile* zeigen, so hätte man erwarten können, daß auch sie imstande wären, Zitronensäure abzubauen. In den betreffenden Versuchen, die ganz genau gleich angestellt wurden wie bei *Bacterium gracile*, erwiesen sich aber die beiden *Micrococcus*-Arten unfähig, die Zitronensäure anzugreifen. So sehr sie in hohem Grade befähigt sind, die Äpfelsäure abzubauen, und so die Säure eines Weines oder Obstweines herabzusetzen, so wären sie also nach dem Vorstehenden nicht imstande, etwa vorkommende Zitronensäure ebenfalls zum Verschwinden zu bringen.

Micrococcus acidovorax und *Mier. variococcus h* vermögen demnach nicht, Zitronensäure, Bernsteinsäure und Milchsäure umzusetzen. Der *Micrococcus malolacticus* Seifert stimmt darin mit unseren beiden Mikrokokken überein.

9. Verhalten des *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus h* gegenüber verschiedenen Alkohol- und Säuremengen.

Die zur Entscheidung dieser Fragen bestimmten Versuche wurden zur gleichen Zeit durchgeführt, wie diejenigen mit *Bacterium mannitopœum* (p. 182). Den Hefeauszug säuerte man mit etwas Weinsäure an und setzte 19,2⁰/₁₀₀ Dextrose (als Invertzucker berechnet) zu. Der Alkoholzusatz erfolgte in Form eines chemisch reinen 99proz. Alkohols. Die Versuchsdauer war wie dort 60 Tage. Temperatur 23° (Resultate s. Tabelle 50).

In der Lösung mit 7,66 Gewichts-Proz. Alkohol vermochten beide Mikrokokken noch zu wachsen und Dextrose umzusetzen, und zwar der *Micrococcus acidovorax* recht ausgiebig, so daß die obere Alkoholgrenze etwa zwischen 9 und 10 Gewichts-Proz. (= ca. 11—13 Vol.-Proz.) liegt; bei 11,69 Gewichts-Proz. war dagegen weder beim einen, noch beim andern das Wachstum möglich. 3,75 Gewichts-Proz. Alkohol haben fast keinen Einfluß ausgeübt. Hier sowohl wie in den Kulturflüssigkeiten ohne Alkohol hat sich *Micrococcus variococcus h* in der Umsetzung der Dextrose

weniger energisch erwiesen als *Micrococcus acidovorax*. Wir konnten die gleiche Verschiedenheit schon bei der Vergärung der Dextrose (p. 241) beobachten. Da es *Micrococcus variococcus* h nicht an geeigneten Baustoffen zum Wachstum fehlen kann, wird der erwähnte Unterschied mehr auf eine geringere Fähigkeit, die Dextrose anzugreifen, zurückgeführt werden müssen. Auch bei 7,66 Gewichts-Proz. Alkohol trat dieser Unterschied zwischen den beiden Mikrokokken, und zwar in gleichem Verhältnis zutage. Der Alkohol hat bei beiden die Umsetzung der Dextrose ungefähr in gleicher Weise herabgesetzt, und so wird denn auch das Maximum der noch erträglichen Alkoholmenge beim *Micrococcus variococcus* h in dieser Lösung, deren Hauptbestandteil ihm nicht besonders zusagt, niedriger liegen als bei *Micrococcus acidovorax*, der die

Tabelle 50.

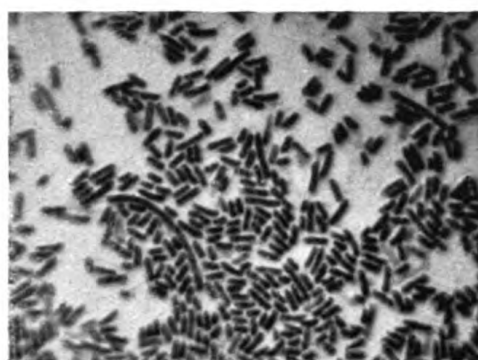
	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug X ohne Alkohol, steril	1,00	0,37	0,59	0,54
„ X „ „ + <i>Micr. acidov.</i>	6,06	0,55	5,45	5,72
„ X „ „ + <i>Micr. varioc. h</i>	2,69	0,48	2,16	2,40
Hefeauszug X + 3,75 Gew.-% Alkohol + <i>Micr. acidov.</i>	5,69	0,56	5,07	5,50
„ X + 3,75 Gew.-% Alkohol + <i>Micr. varioc. h</i>	2,68	0,48	2,15	2,16
Hefeauszug X + 7,66 Gew.-% Alkohol + <i>Micr. acidov.</i>	2,81	0,49	2,27	2,36
„ X + 7,66 Gew.-% Alkohol + <i>Micr. varioc. h</i>	1,88	0,48	1,35	1,34
Hefeauszug X + 11,69 Gew.-% Alkohol + <i>Micr. acidov.</i>	0,94	0,42	0,48	0,44
„ X + 11,69 Gew.-% Alkohol + <i>Micr. varioc. h</i>	1,07	0,44	0,59	0,44

Dextrose besser anzugreifen vermag. In einem anderen für *Micrococcus variococcus* h günstigeren Medium würde dann voraussichtlich auch von diesem mehr Alkohol ertragen. Mit dieser Auffassung stehen die Mitteilungen Seiferts (2; p. 4) im Einklang, der angibt, daß in einem Hefedekokt mit 6‰ Äpfelsäure und bei 9,0 Vol.-Proz. Alkoholgehalt eine Entwicklung des *Micrococcus malolacticus* stattfand, bei 9,8 Vol.-Proz. schon nicht mehr, während der gleiche *Micrococcus* in einer äpfelsäurehaltigen Fleischpepton-Nährlösung selbst bei 12 Vol.-Proz. Alkohol noch einen starken Säureabbau verursachte. Von den 4 von uns untersuchten Bakterien erweist sich das *Bacterium manni-topœum* in dextrosehaltiger Lösung als am widerstandsfähigsten gegen Alkohol (Grenze bei ca. 12–13 Vol.-Proz.). Schon etwas weniger energisch und widerstandsfähig gegen Alkohol erwies sich *Micrococcus acidovorax* (Grenze etwa zwischen 11 und 12 Vol.-Proz.). Merklich schwächer gegenüber Alkohol ist *Micrococcus variococcus* h (Grenze etwa zwischen 10 und 11 Vol.-Proz.). Am schwächsten erzeugte sich *Bacterium gracile*, das bei ca. 10 Vol.-Proz. Alkohol kaum mehr zu gären vermag.

Um den Einfluß der Säure auf das Verhalten der beiden Mikrokokken zu prüfen, wählte man Äpfelsäure, weil diese bei Wein und



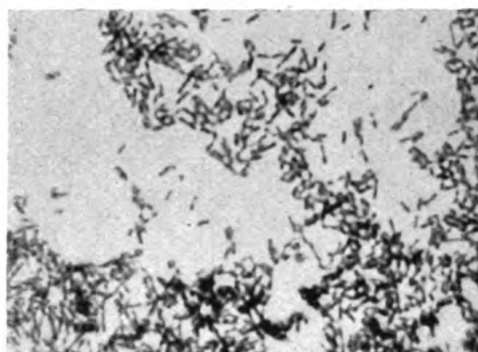
1. (1200)



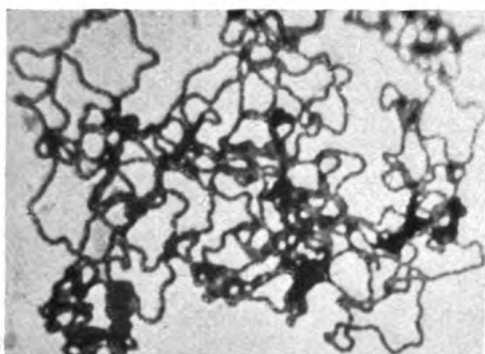
2. (1200)



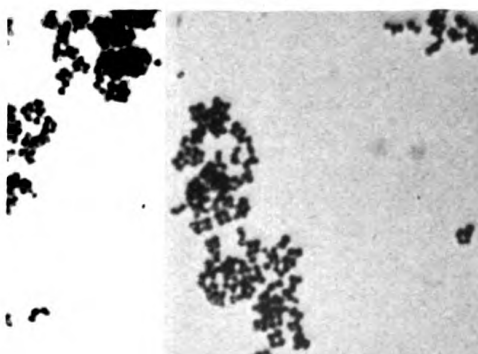
3. (1200)



4. (1200)



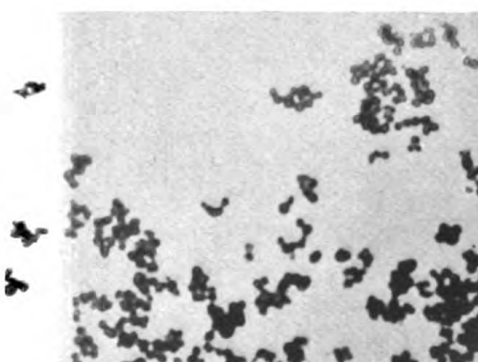
5. (1200)



6. (1200)



7. (1200)



8. (1200)

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Obstwein hauptsächlich in Betracht kommt. Allerdings mußte man gewärtigen, daß die Bakterien einen Teil der Säure abbauen und dadurch das Resultat des Versuchs beeinflussen können. Allein, wenn es sich darum handelt, die obere Grenze des von den Bakterien noch zu ertragenden Säuregehaltes festzustellen, kommt dieser Umstand weniger in Betracht, weil bei Beginn des Versuches die Säure noch vorhanden und andererseits der Säureabbau in der Nähe dieser oberen Grenze nur noch gering ist. Den zum Versuche angewendeten Hefeauszügen wurde außer den in der Tabelle angegebenen Äpfelsäuremengen auch noch ca. 10⁰/₁₀₀ Dextrose zugefügt. Versuchsdauer 7 Wochen. Temperatur 23⁰.

Tabelle 51.

					Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure
					g im l	g im l	g im l	g im l
Hefeauszug IX	+ 3,15 ⁰ / ₁₀₀	Äpfels., steril	3,15	0,35	2,76	0,54
" IX	"	" + Micr. acidov.	5,56	0,52	4,99	5,40
" IX	"	" + Micr. varioc. h	2,68	0,43	2,21	3,60
Hefeauszug IX	+ 6,56 ⁰ / ₁₀₀	Äpfels., steril	6,56	0,35	5,17	0,54
" IX	"	" + Micr. acidov.	5,29	0,49	4,75	5,62
" IX	"	" + Micr. varioc. h	3,61	0,56	2,99	4,50
Hefeauszug IX	+ 9,65 ⁰ / ₁₀₀	Äpfels., steril	9,65	0,35	9,26	0,54
" IX	"	" + Micr. acidov.	9,31	0,37	8,90	0,50
" IX	"	" + Micr. varioc. h	9,31	0,41	8,86	0,36
Hefeauszug IX	+ 12,46 ⁰ / ₁₀₀	Äpfels., steril	12,46	0,35	12,07	0,54
" IX	"	" + Micr. acidov.	12,19	0,40	11,75	0,48
" IX	"	" + Micr. varioc. h	12,36	—	—	—

Die beiden Mikrokokken zeigten sich gegenüber einem höheren Gehalt an Äpfelsäure ziemlich empfindlich, indem schon bei 9,65⁰/₁₀₀ Äpfelsäure kein Wachstum mehr stattfand, während *Bacterium gracile* in dieser Lösung noch ganz vorzüglich gedieh, ja selbst bei 12,46⁰/₁₀₀ Äpfelsäure einen starken Säureabbau verursachte und bei 15,54⁰/₁₀₀ noch eine schwache Wirkung zeigte. In der Lösung mit 3,15⁰/₁₀₀ hat *Micrococcus variococcus* h die Äpfelsäure fast ganz abgebaut. Weiter hat der *Micrococcus acidovorax* die Umsetzungen getrieben, indem, nach dem hohen Gehalt an Milchsäure und Gesamtsäure zu schließen, auch Dextrose vergoren worden sein muß.

Bei 6,56⁰/₁₀₀ Äpfelsäure hat *Micrococcus variococcus* h die Äpfelsäure noch nicht vollständig abgebaut. Es muß noch etwas Äpfelsäure übrig geblieben sein, die zusammen mit der Milchsäure (als Äpfelsäure berechnet) den Betrag der Gesamtsäure ergibt. Der *Micrococcus acidovorax*, der energischer arbeitete, hat hier neben der Äpfelsäure noch etwas mehr Dextrose angegriffen. Die Umsetzungen durch die beiden *Micrococcus* in den Dextrose enthaltenden und verschiedenen Äpfelsäuregehalt aufweisenden Hefeauszügen zeigen Übereinstimmung mit den bei *Bacterium gracile* (p. 216) in denselben Kulturflüssigkeiten beobachteten Vorgängen. In beiden Fällen wird die Äpfelsäure in erster Linie abgebaut, doch daneben auch Dextrose angegriffen. Aus unseren Versuchen

geht hervor, daß Dextrose vergoren wurde, bevor alle Äpfelsäure zer-
setzt war.

Der *Micrococcus malolacticus* erträgt nach Seifert (2; p. 7) viel höhere Säuregehalte als unsere *Micrococcus*-Arten. In Fleischpepton-Nährlösung mit 14,6‰ Äpfelsäure vermochte er noch rasch zu wachsen und in 14 Tagen einen Säureabbau von 14,6 auf 8,0‰ zu verursachen. Allerdings muß hinzugefügt werden, daß Seifert sowohl hier als bei dem vorhin erwähnten Versuch mit Alkohol nicht den rein gezüchteten Organismus verwendete, sondern einen Weintrub, in dem er sich vorfand.

10. Einfluß der Temperatur auf die Gärtätigkeit von *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* h.

Auch hier wurde wie bei den entsprechenden Versuchen von *Bacterium mannitopæum* (p. 185) und *Bacterium gracile* (p. 218) ein Obstsaft und zwar von der Schweizer Wasserbirne verwendet. Die den sterilisierten Saft enthaltenden Flaschen kamen nach der Infektion mit den Bakterien und unter Verschuß mit Gärröhrchen in verschiedene Fächer eines großen Panum'schen Thermostaten zu stehen. Die Temperaturen und die Versuchsdauer waren dieselben.

Der Obstsaft enthielt anfänglich 2,27‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure), 0,19‰ flüchtige Säure (als Essigsäure) und 0,56‰ Milchsäure. Der Versuch mit *Micrococcus acidovorax* ergab das in Tabelle 52 zusammen-
gestellte Resultat.

Tabelle 52.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l			Flüchtige Säure als Essigsäure g im l			Milchsäure g im l		
	nach 10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen	10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen	10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen
bei 6,5°	2,14	1,14	1,41	0,16	0,17	0,21	1,01	2,12	2,70
9,8°	1,40	1,41	1,54	0,13	0,14	0,15	1,90	2,80	3,02
14,0°	1,20	1,67	1,80	0,10	0,13	0,14	2,92	3,24	3,02
18,5°	1,68	2,01	2,07	0,23	0,17	0,25	3,36	3,46	3,70
22,5°	1,87	2,48	2,81	0,19	0,18	0,31	3,70	4,14	4,16
26,5°	2,34	2,95	3,08	0,11	0,16	0,21	4,04	4,60	4,66
34,5°	1,54	1,94	2,14	0,12	0,12	0,21	3,24	3,36	3,48

Micrococcus acidovorax zeigte in diesem Obstsaft eine sehr gute Entwicklung. Selbst bei der tiefsten Temperatur, nämlich 6,5°, trat in den betreffenden Versuchsflüssigkeiten schon nach 6 Tagen eine deutliche Trübung ein, und am 10. Tage ließ die Analyse erkennen, daß auch schon eine Umsetzung stattgefunden hatte. Während man bei *Bacterium mannitopæum* und zum Teil auch bei *Bacterium gracile* die Zunahme an flüchtiger Säure als Maßstab der Bakterientätigkeit benutzen kann, ist dies hier natürlich ausgeschlossen, da *Micrococcus acidovorax* weder aus Äpfelsäure, noch aus Zucker flüchtige Säure bildet, wie übrigens aus der Tabelle aufs neue klar hervorgeht. Auch die Veränderung der Gesamtsäure kann nicht maßgebend sein, da sie die Resultierende zweier entgegengesetzten Vorgänge ist, nämlich des Säureabbaues und der Säurebildung.

Es bleibt also nur die Zunahme der Milchsäure als Maßstab der Bakterientätigkeit.

Die günstigste Temperatur sowohl für die Säuerungsgeschwindigkeit als auch für die Erreichung eines hohen Säuregrades liegt hier bei 26,5°. Bei 34° war die Säurebildung schon merklich geringer, was als Beweis einer schwächenden Einwirkung dieser Temperatur auf den *Micrococcus* betrachtet werden darf. Bei 6,5° hat der *Micrococcus* schon verhältnismäßig stark gewirkt. Die Menge der erzeugten Milchsäure übertrifft bei allen drei Untersuchungsterminen die durch *Bacterium gracile* gebildete. Selbst eine niedere Kellertemperatur schützt also nicht vor dem Säureabbau durch diesen *Micrococcus*.

Für seinen *Micrococcus malolacticus* gibt Seifert an, daß er am besten zwischen 25 und 34° C gedeihe, worin dieser Organismus mit unserem *Micrococcus acidovorax* übereinstimmen würde. Dagegen deutet die Angabe, daß er bei 3—4° nicht mehr wachse, auf eine weitere Verschiedenheit hin; denn es ist nicht wohl anzunehmen, daß *Micrococcus acidovorax*, der bei 6,5° noch so rasch wächst und so energisch wirkt, bei 4° gar nicht mehr zu wachsen vermöchte.

In gleicher Weise wurde auch *Micrococcus variococcus* h auf sein Verhalten gegenüber verschiedenen Temperaturen geprüft (Tabelle 53).

Tabelle 53.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l			Flüchtige Säure als Essigsäure g im l			Milchsäure g im l		
	nach 10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen	10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen	10 Tagen	23 Tagen	79 Tagen
bei 6,5°	2,28	2,34	1,14	0,13	0,09	0,28	0,54	0,56	1,90
9,8°	2,21	2,07	1,00	0,17	0,13	0,17	0,60	0,90	2,24
14,0°	1,87	1,87	1,00	0,14	0,09	0,14	0,90	1,01	2,46
18,5°	1,81	1,47	1,00	0,16	0,12	0,23	1,16	1,68	2,56
22,5°	1,47	1,21	1,07	0,14	0,13	0,14	1,40	2,12	2,46
26,5°	1,14	1,21	1,41	0,13	0,12	0,34	2,46	2,70	2,84
34,5°	2,28	1,27	1,61	0,06	0,10	0,19	0,76	2,46	3,02

Für die Beurteilung dieser Zahlen gilt dasselbe, was bei Besprechung der Tabelle 52 angeführt wurde. Bemerkenswert sind wiederum die geringen Mengen flüchtiger Säure. Wie *Micrococcus acidovorax* bildet auch *Micrococcus variococcus* h beim Abbau von Äpfelsäure und Zucker keine flüchtige Säure, und daß dies auch bei verschiedenen Temperaturen zutrifft, geht aus der Tabelle deutlich hervor. *Micrococcus variococcus* h wirkt, wie aus den Milchsäuregehalten zu ersehen ist, entschieden weniger energisch als *Micrococcus acidovorax*, in den ersten 10 Tagen bei den meisten Temperaturen nicht einmal halb so stark. Die größte Säuerungsgeschwindigkeit liegt auch bei diesem *Micrococcus* bei 26,5° und ebenso der höchste Säuregrad, wenn man den Termin vom 23. Tag in Betracht zieht. Nun wurde allerdings bei 34,5° bis zum 79. Tage etwas mehr Milchsäure gebildet als bei 26,5°. Allein hierzu möchten wir bemerken, daß bei verschiedenen gleich behandelten Versuchsflaschen ohne erkennbare Ursache Verschiedenheiten sich einstellen können; vielleicht

ist hierauf das eben erwähnte Vorkommnis zurückzuführen und ebenso der auffällig niedere Gehalt an Milchsäure bei dieser Temperatur am 10. Tage. Bei den niederen Temperaturen ist die Wirkung des *Micrococcus variococcus h* merklich gehemmt; er unterscheidet sich hierin vom *Micrococcus acidovorax* und stimmt mehr mit *Bacterium gracile* (p. 218) überein.

11. Einfluß des Sauerstoffzutrittes auf *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus h*.

Wie für die beiden *Bacterium*-Arten, so wurde auch für die beiden *Micrococcus*-Arten der Einfluß des freien Sauerstoffes auf die Gärstätigkeit untersucht und zu diesem Zweck der gleiche Hefeauszug (p. 187) benutzt. An der zitierten Stelle findet sich auch die Versuchsanstellung beschrieben. Versuchsdauer 39 Tage. Temperatur 19°.

Tabelle 54.

			Gesamtsäure als Apfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Essigsäure g im l	Milchsäure g im l
Hefeauszug	X mit 19,20/100	Dextrose, steril	1,03	0,37	0,62	0,54
"	X " "	" + <i>Micr. acidov.</i> mit Luft	5,83	0,50	5,28	5,40
"	X " "	" + <i>Micr. acidov.</i> ohne Luft	6,09	0,49	5,55	5,40
Hefeauszug	X mit 19,20/100	Dextr. + <i>Micr. varioc. h</i> mit L.	2,14	0,49	1,60	1,56
"	X " "	" + <i>Micr. varioc. h</i> ohne Luft	2,28	0,46	1,77	1,90

Beide Mikrokokken können sowohl bei Sauerstoffzutritt als bei Sauerstoffabschluß wachsen und Dextrose unter Bildung von Milchsäure abbauen. In beiden Fällen wird fast keine flüchtige Säure gebildet. Beim *Micrococcus variococcus h* wird der Gärvorgang durch Abschluß von Sauerstoff etwas gefördert. Auch bei *Micrococcus acidovorax* läßt sich noch eine kleine Förderung wahrnehmen, sofern man nur den Gehalt an Gesamtsäure ins Auge faßt. Immerhin sind die Unterschiede klein und glauben wir doch diese beiden Mikrokokken als fakultative Anaerobier betrachten zu sollen. Die Verschiedenartigkeit der beiden Organismen tritt auch hier wieder deutlich hervor, insofern als *Micrococcus variococcus h* beträchtlich schwächer gärt. Dagegen stimmen sie im Verhalten gegenüber Sauerstoffabschluß überein.

12. *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus h, l, m* und *n* in unvergorenen Obst- und Traubensäften.

Es erschien wünschenswert, das Verhalten der beiden *Micrococcus*-Arten auch in denjenigen Medien kennen zu lernen, in denen sie gelegentlich eine so große Rolle spielen. Es wurden zu diesen Feststellungen die gleichen Obst- und Traubensäfte verwendet wie bei *Bacterium mannitolopæum*

(p. 188). Auch die Versuchsanstellung war die dort beschriebene. Die vorgängig sterilisierten Obstsaften befanden sich in mit Gärverschlüssen versehenen 300 ccm-Flaschen bei durchschnittlich 15°. In den in Tabelle 55 aufgeführten Säften kamen einige Rassen des *Micrococcus variococcus* in Betracht, nämlich *Micrococcus variococcus* l, m und n, in dem darauffolgenden Versuch mit Wasserbirnensaft (Tabelle 56) dann die bisher einläßlich studierten *Micrococcus acidovorax*, *Micrococcus variococcus* h und daneben noch *Micrococcus variococcus* n.

Tabelle 55.

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Theilersbirnensaft 1906, steril	131,04	3,45	0,33	3,09	190,9
„ „ + <i>Micr. varioc.</i> l	127,26	3,41	0,37	3,00	186,4
„ „ + <i>Micr. varioc.</i> m	128,44	3,61	0,39	3,18	188,7
„ „ + <i>Micr. varioc.</i> n	128,25	3,81	0,39	3,38	187,8
Reinholzbirnensaft 1903, steril	132,38	3,55	0,19	3,34	181,7
„ „ + <i>Micr. varioc.</i> l	129,36	3,45	0,26	3,16	179,4
„ „ + <i>Micr. varioc.</i> m	129,90	3,85	0,20	3,63	180,3
„ „ + <i>Micr. varioc.</i> n	131,95	3,78	0,24	3,52	177,0

Im Theilersbirnensaft ließ sich durch die von uns vorgenommenen Bestimmungen (Gesamtsäure, flüchtige Säure, Extrakt und Zucker) eine von den Bakterien bewirkte Veränderung nicht feststellen. Nachdem wir durch später ausgeführte, im Vorstehenden bereits mitgeteilte Versuche das Wesen dieser Mikrokokken kennen gelernt haben, und wissen, daß sie keine flüchtige Säure bilden, und infolge Säureabbau und Milchsäurebildung den Gesamt-säuregehalt unter Umständen wenig ändern, dürfen wir aber aus den in der Tabelle angeführten Ergebnissen nicht schließen, daß die Bakterien nicht gewachsen sind. Milchsäure-Bestimmungen, die zu jener Zeit leider unterlassen wurden, hätten über die Bakterientätigkeit sichern Aufschluß gegeben. Die mikroskopische Betrachtung ließ übrigens erkennen, daß die Mikrokokken sich vermehrt und ein Depot gebildet hatten, allerdings war dieses nicht mächtig; allein bei diesen Bakterien ist letzteres auch dann nicht der Fall, wenn sie ziemlich starke Umsetzungen vollzogen haben. Die Mikrokokken fanden sich in Form von Diplokokken und Tetraden. Nach unseren heutigen Kenntnissen dürfen wir schließen, daß bei einer derartigen Entwicklung der Bakterien die Äpfelsäure des Obstweines ziemlich abgebaut sein und die Gesamtsäure aus Milchsäure bestehen mußte.

Auch im Reinholzbirnensaft (Tabelle 55) sind die verschiedenen *Micrococcus*-Rassen gewachsen, n vielleicht etwas weniger als die übrigen. Dieser *Micrococcus variococcus* n hat auch hier seine schon früher hervorgehobene Eigenschaft gezeigt, im Depot Zoogloeengruppen zu bilden, während bei den beiden anderen *Micrococcus variococcus* h und m dies nicht der Fall war. Die Bakterien werden ebenfalls Umsetzungen verursacht haben, die aber nach den ausgeführten Bestimmungen in der Tabelle nicht deutlich hervortreten. Dagegen läßt sich bei näherer

Überlegung, ähnlich wie dies beim Theilersbirnsaft geschehen, dartun, daß ein Abbau der Säure und auch von etwas Zucker unter Bildung von Milchsäure stattgefunden hat.

In einem später vorgenommenen Versuch mit Birnsaft (von Schweizer Wasserbirnen) wurde dann auch die Milchsäure bestimmt. Über die Versuchsanstellung ist Näheres auf p. 188 zu finden. Hier mag nur hervorgehoben sein, daß die Flaschen nicht mit Gärverschlüssen, sondern mit Wattestopfen verschlossen waren. Versuchsdauer 7 Wochen bei 23°.

Tabelle 56.

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Wasserbirnsaft, steril	89,97	2,21	0,18	2,01	0,78
„ + Micr. acidov.	91,2	1,67	0,18	1,47	2,13
„ + Micr. varioc. h	89,2	1,54	0,12	1,41	1,68
„ + Micr. varioc. n	90,9	1,47	0,11	1,35	1,51

Da der Wasserbirnsaft verhältnismäßig wenig Säure enthielt und in dieser Hinsicht für das Bakterienwachstum günstig war, so hätte man wohl eine etwas weitergehende Umsetzung erwarten dürfen; wie aus den Zahlen der Tabelle zu ersehen ist, wurde nur die Äpfelsäure des Birnsaftes abgebaut, dagegen kein Zucker angegriffen. Da *Micrococcus acidovorax* im gleichen Obstsaft bei Anwendung von Gärverschlüssen bei 22,5° schon in 23 Tagen ca. 4‰ Milchsäure gebildet hat (s. Tabelle 52, p. 258), so neigen wir dazu, die geringe Bakterientätigkeit im vorliegenden Versuche wie bei *Bacterium gracile* (p. 220) der Art des Flaschenverschlusses zuzuschreiben. Die beiden Vertreter *Micrococcus variococcus h* und *n* haben sich hier ziemlich übereinstimmend verhalten und sich wieder weniger energisch erwiesen als *Micrococcus acidovorax*. *Micrococcus variococcus h* und *n* unterscheiden sich aber doch auch wieder und zwar in der Beschaffenheit der Depots, indem, wie beim Reinholzbirnsaft, dieses bei *h* eine fein mehlartige, bei *n* eine körnige Beschaffenheit zeigte.

Um die *Micrococcus l, m* und *n* genauer kennen zu lernen und event. unterscheiden zu können, wurden sie einem Versuch unterzogen, wie er auf p. 191 für *Bacterium mannitolopæum* beschrieben ist. In genau gleicher Weise wie dort wurden sie in Marxenbirn-, Schellerbirn- und Fischbächlersaft ausgesät. Wie die mikroskopische Untersuchung ergab, wuchsen sie jedoch in diesen Säften nicht, was auf deren chemische Beschaffenheit zurückzuführen ist. Die Säfte zeigten folgende Gehalte:

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l
Marxenbirnsaft	109,18	4,08	0,07	146,7
Schellerbirnsaft 1904	116,92	4,42	0,06	171,1
Fischbächlersaft 1906	110,03	7,97	0,18	157,8

Außerdem enthielten der Schellerbirn- und der Marxenbirnsaft ziemlich viel Gerbstoff. Während beim Fischbäcklersaft der Säuregehalt das Wachstum der Bakterien sicher zu verhindern vermochte, (Tabelle 51, p. 257), so wird bei den beiden anderen Säften der Gerbstoff einen wachstumshemmenden Einfluß ausgeübt haben.

Auch in dem bei *Bacterium mannitolpœum* verwendeten Traubensaft (p. 192) aus Trauben der Sorte Räuschling mit 11,4‰ Gesamtsäure (als Weinsäure) wurden *Micrococcus variococcus* l, m und n ausgesät, aber, wie nun selbstverständlich erscheint, ohne jeden Erfolg. Der hohe Säuregehalt verhinderte jede Entwicklung der Bakterien.

In den in diesem Abschnitte mitgeteilten Versuchen vermochten unsere *Micrococcus*-Arten nur dann zu wachsen, wenn die Obstsäfte keinen hohen Gerbstoff- oder Säuregehalt besaßen. Die Säfte wurden dabei geschmacklich nicht in starker Weise verändert. Gesamtsäuregehalt und Gehalt an flüchtiger Säure blieben sich ungefähr gleich. An Stelle der abgebauten Säure trat aus Äpfelsäure und Zucker neugebildete Milchsäure.

13. Gegenseitige Beeinflussung von *Micrococcus acidovorax*, *Micrococcus variococcus* h und n einerseits und Hefe andererseits.

Um sicher zu sein, daß die Bakterien zur Entwicklung gelangen, säete man in die in üblicher Weise vorbereiteten Obstsäfte zuerst nur die Bakterien aus und erst 14 Tage später die Hefe. Vergleiche das Verfahren bei *Bacterium mannitolpœum* (p. 194). Den Schellerbirnsaft 1906 entsäuerte man teilweise mit reinem kohlensauren Calcium, um das Bakterienwachstum zu begünstigen. Er enthielt dann 128,76 g Zucker als Invertzucker und 2,27 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure) im Liter. Versuchsdauer 170 Tage; Temperatur 15°.

Von den 3 Mikrokokken im Schellerbirnsaft ist *Micrococcus acidovorax* am besten gewachsen, *Micrococcus variococcus* h bedeutend weniger und *Micrococcus variococcus* n so gut wie gar nicht. Im Depot des *Micrococcus acidovorax* fanden sich zahlreiche Tetraden, daneben aber auch Zoogloeengruppen und besonders da, wo noch Hefe vorhanden war, schön ausgebildete Bakterienblasen mit bis zu 130 µ Durchmesser. Dementsprechend waren auch die Umsetzungen verschieden. *Micrococcus acidovorax* hat die Säure stark abgebaut. Weil der Saft neutral reagierte, können wir schließen, daß die Äpfelsäure in Form von saurem äpfelsaurem Calcium vorhanden war, und daß das beim Abbau der Säure frei werdende Calcium die entstehende Milchsäure neutralisierte. Bei den Mikrokokken h und n ist der Säureabbau lange nicht so weit gediehen. Flüchtige Säure wurde durch die Bakterien fast keine erzeugt. Die Versuchsflüssigkeiten mit Hefe enthielten hievon etwas mehr, wohl infolge der Hefetätigkeit. Hiermit steht im Einklang, daß die Bakterien keine hemmende Einwirkung auf die Gär-tätigkeit der Hefe ausgeübt haben. Der Zucker des Obstsafes ist bei Gegenwart aller 3 Bakterien ziemlich vollständig vergoren.

Zur Zeit, als die Hefe den Versuchsflüssigkeiten zugefügt wurde, war die Bakterientätigkeit noch nicht abgeschlossen, und ein Einfluß der Hefe

auf diese möglich. Vergleicht man den Gehalt an Gesamtsäure und Milchsäure in den beiden Versuchsflüssigkeiten mit *Micrococcus acidovorax* mit und ohne Hefe, so erkennt man, daß da, wo Hefe vorhanden war, die Bakterientätigkeit weiter vorgeschritten ist. Ohne Hefe ist die Säure zwar vollständig abgebaut, aber offenbar wurde noch kein Zucker vergoren; daher die neutrale Reaktion, die wir uns nur so erklären können, daß die ursprünglich saure Reaktion des teilweise entsäuerten Schellerbirnsaftes von saurem äpfelsaurem Calcium herrührt. Bei der Umsetzung dieser Verbindung genügt dann das freiwerdende Calcium gerade, die entstehende Milchsäure zu binden. An Stelle des sauren äpfelsauren Calciums ist neutrales milchsaures Calcium getreten; der Saft ist nun neutral.

Tabelle 57.

	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Schellerbirnsaft 1906 (entsäuert), steril . .	—	2,27	0,12	2,14	—	185,8
„ „ + <i>Micr. acidov.</i>	—	0,0 ¹⁾	0,23	—	—	181,6
„ „ + <i>Micr. acidov.</i> + Hefe	63,33	1,14	0,42	0,68	5,50	43,2
„ „ + <i>Micr. varioc. h</i>	—	1,47	0,33	1,11	—	—
„ „ + <i>Micr. varioc. h</i> + Hefe	63,40	3,35	0,36	2,95	1,12	43,8
„ „ + <i>Micr. varioc. n</i>	—	2,21	0,12	2,08	—	186,8
„ „ + <i>Micr. varioc. n</i> + Hefe	63,52	3,35	0,61	2,68	1,12	44,7

In dem Saft, wo Hefe mit dem *Micrococcus* zusammenwirkte, hat, wie der hohe Milchsäuregehalt zeigt, dieser soeben beschriebene Vorgang ebenfalls stattgefunden. Doch berechnet sich aus der neugebildeten Milchsäure $5,50 - 0,50 = 5,0$ g ein so hoher Gehalt an ursprünglich vorhandener Äpfelsäure (7,4 g), daß diese nicht nur in Form von saurem äpfelsaurem Calcium vorhanden gewesen sein kann. Nach der Bestimmung der titrierbaren Gesamtsäure könnten höchstens 4,54 g Äpfelsäure sich in diesem Zustand gefunden haben. Es ist nun wohl denkbar, daß auch noch neutrales äpfelsaures Calcium vorhanden war, bei dessen Abbau ebenfalls Milchsäure entstand. Wenn die Reaktion des Saftes dabei nicht alkalisch wurde, so ist dies wohl der Bildung von Säure durch die Hefe (Bernsteinsäure usw.) zuzuschreiben. Auf eine solche Säurebildung weist die Beschaffenheit der mit *Micrococcus variococcus n* versetzten Säfte hin. Dieser *Micrococcus* wuchs hier nicht; die mit Hefe vergorene Flüssigkeit enthielt aber 1,14⁰/₁₀₀ Säure mehr als die ohne Hefe.

Ein gleicher Versuch wurde auch mit einem nicht entsäuerten Reinholzbirnsaft durchgeführt. Die Bakterien entwickelten sich darin verhältnismäßig gut, was schon aus der Bildung der Depots zu erkennen war und außerdem mikroskopisch nachgewiesen wurde. Auch die in nachfolgender Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnisse lassen dies erkennen.

¹⁾ Der Saft reagierte neutral.

Tabelle 58.

	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Reinholzbirnsaft 1907, steril	—	2,68	0,34	2,31	—	169,5
„ „ + <i>Micr. acidov.</i>	—	2,88	0,31	2,55	3,02	170,2
„ „ + <i>Micr. acidov.</i> + <i>H.</i>	59,3	3,48	0,54	2,89	2,92	35,8
„ „ + <i>Micr. varioc. h.</i>	—	2,34	0,41	1,89	2,12	166,2
„ „ + <i>Micr. varioc. h.</i> + Hefe	55,9	3,35	0,61	2,68	2,80	46,3
„ „ + <i>Micr. varioc. n.</i>	—	2,21	0,46	1,70	1,90	169,6
„ „ + <i>Micr. varioc. n.</i> + Hefe	63,4	3,61	0,62	2,93	2,06	—

Die 14 Tage nach Aussaat der Bakterien zugefügte Hefe verursachte eine normale Gärung, die nur bei *Micrococcus variococcus h* nicht ganz fertig verlief. Da flüchtige Säure hier nicht einwirken konnte, so gelangt man zu der Annahme, daß dieser *Micrococcus* imstande ist, eine andere gärungshemmende Substanz in diesem Saft auszuschcheiden. Die *Micrococcus*-Arten verhalten sich in dieser Beziehung abweichend von *Bacterium mannitopœum* und *Bacterium gracile*, die im gleichen Obstsaft die Hefetätigkeit ganz bedeutend einschränkten. Allerdings bildeten diese Bakterien mehr flüchtige Säure, aber der Unterschied ist doch nicht so groß, daß wir hierauf allein das verschiedene Verhalten zurückführen könnten.

Um hier den Einfluß der Hefe auf die Bakterien zu erkennen, empfiehlt es sich zuerst, die Wirkung der Bakterien allein festzustellen. Alle 3 Bakterien vermochten deutliche Umsetzungen unter Bildung von Milchsäure zu verursachen. Die Menge der gebildeten Milchsäure ist jedoch größer als der ursprünglichen Gesamtsäure entspricht, wenn man die ganze Menge als freie Äpfelsäure annimmt. Da ein Teil der Milchsäure nachher in vollständig freiem Zustand sich befindet, und die nicht flüchtige Säure zugenommen hat, muß angenommen werden, daß auch noch etwas Zucker unter Bildung von Milchsäure abgebaut wurde und ein geringer Teil der Gesamtsäure (ca. 0,7⁰/₁₀₀), wahrscheinlich nicht Äpfelsäure, unzersetzt blieb. Die gebildete Milchsäure von ca. 2,5 g ergibt 1,8 g, in Äpfelsäure umgerechnet; dazu die nicht abgebaute Säure 0,7 g = 2,5 g, was der bestimmten nicht flüchtigen Säure entspricht. Ähnlich liegen die Verhältnisse da, wo die beiden anderen Mikrokokken allein wirkten. Vergleicht man damit die Obstsaft, in denen Hefe und Bakterien sich befanden, so läßt sich mit Ausnahme des Saftes mit *Micrococcus variococcus h*, in dem ein geringer fördernder Einfluß von der Hefe ausging, eine hemmende oder günstige Wirkung der Hefe auf die Bakterientätigkeit nicht sicher erkennen.

In beiden Versuchen haben die Bakterien keinen (oder nur einen geringen bei *Micrococcus variococcus h* im Reinholzbirnsaft) hemmenden Einfluß auf die Hefetätigkeit ausgeübt, im Gegensatz zu *Bacterium mannitopœum* und *Bacterium gracile* im Reinholzbirnsaft. Ein Einfluß der Hefe auf die Bakterientätigkeit konnte nur im Schellerbirnsaft bei *Micrococcus acidovorax*, sowie im Reinholz-

birnsaft bei *Micrococcus variococcus* h und zwar in förderndem Sinn erkannt werden.

14. *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* h in Weinen und Obstweinen.

In erster Linie möchten wir hier einen Versuch mit einem Spätburgunder oder Clävner, Jahrgang 1910, anführen, der z. T. auch mit *Bacterium gracile* und *Bacterium mannitolpæum* durchgeführt wurde. Auf p. 196 ist die Versuchsanstellung näher beschrieben, so daß dieselbe hier nur kurz erwähnt werden kann. Ein Teil des im Faß fertig entwickelten Weines wurde, weil säurereich, mit reinem Calciumkarbonat auf 6,8‰ (als Äpfelsäure) entsäuert. Da hierdurch das Bakterienwachstum vielleicht noch nicht genügend gesichert war, versetzte man einen Teil der Versuchsflaschen auch noch mit der Kahlmhefe 5 unserer Sammlung, in der Voraussetzung, daß diese den Nährboden für die Bakterien noch günstiger gestalte. Diese anfänglich mit Wattestopfen versehenen Flaschen wurden nach ca. 8 Tagen mit Gärverschlüssen versehen, um die Verhältnisse gleich zu gestalten wie bei den übrigen Flaschen. Selbstverständlich sind sämtliche Versuchsweine in den Flaschen vor Zusatz der Organismen sterilisiert worden. Versuchsdauer 4 Wochen. Temperatur 19°.

Tabelle 59.

	Alkohol	Gesamt- säure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Clävnerwein 1910, nicht entsäuert, steril .	—	10,01	0,34	9,64	1,01	—
„ „ entsäuert + steril . .	—	6,80	0,30	6,47	1,12	—
„ „ + Kahlmhefe 5 . . .	64,28	6,60	0,61	5,93	1,30	26,3
„ „ + Micr. acidov. . . .	80,35	3,60	0,41	3,15	5,16	23,9
„ „ + Micr. acidov. + Kahlmhefe 5	66,46	3,87	0,54	3,28	5,22	23,5
„ „ + Micr. acid. + Bact. mannit. + Bact. grac.	—	3,60	0,57	2,97	5,1	—

In dem nicht entsäuerten Weine vermochten sich die Bakterien nicht zu entwickeln. Dagegen trat in den Flaschen mit dem entsäuerten Wein, da, wo *Micrococcus acidovorax* allein oder mit den übrigen Bakterien (*Bacterium mannitolpæum*, *Bacterium gracile*) sich vorfand, schon bald eine ziemlich starke Gärung ein, die sich in einer entsprechenden Trübung und Kohlensäureentwicklung bemerkbar machte. Da bei dem Versuch über den Einfluß des Säuregehaltes *Micrococcus acidovorax* bei 6,56‰ Äpfelsäure noch gut gedieh, so ist erklärlich, daß er auch in diesem Wein sich lebhaft vermehrte und energisch wirkte. Er unterscheidet sich darin von den beiden *Bacterium*-Arten, die hier nicht wuchsen, *Bacterium mannitolpæum*, weil dieses die Säure nur schwer abzubauen vermag und keine andere geeignete Nahrung fand, und *Bacterium gracile*, das aus uns noch unbekannten

Gründen in diesem Weine nicht zu wachsen vermochte. Auch in dem vorliegenden Versuch, wo alle 3 Bakterien zusammen zugesetzt wurden, hat sich nur *Micrococcus acidovorax* vermehrt. Die Kahlhefe vermochte die Entwicklung und Tätigkeit des *Micrococcus acidovorax* nicht zu fördern. Sie hat allerdings auch den Säuregehalt nicht wesentlich herabgesetzt und sich in der Hauptsache auf den Alkoholkonsum beschränkt. Dementsprechend waren die Umsetzungen in den Versuchsfaschen mit *Micrococcus acidovorax* mit und ohne die übrigen Organismen übereinstimmend.

Der *Micrococcus* erwies sich wieder als ein reiner Milchsäuregärer, der neben viel Milchsäure nur wenig flüchtige Säure bildet. Wo er allein wirkte, entstand 4,04 g Milchsäure, was dem Abbau von 5,9 g Äpfelsäure entsprechen würde. Nun ist aber wohl mehr Äpfelsäure vorhanden, denn bei der teilweisen Entsäuerung wurde saures äpfelsaures Calcium gebildet und von diesem kommt beim Titrieren nur die Hälfte der Äpfelsäure zur Wirkung. Es muß also ein Teil der Äpfelsäure bzw. des sauren äpfelsauren Calciums unzersetzt geblieben sein. Die am Schluß des Versuches gefundene nicht flüchtige Säure besteht demnach zum Teil aus dieser nicht abgebauten Äpfelsäure etwas Weinsäure und Bernsteinsäure und vielleicht nur zum kleinsten Teil aus Milchsäure, während die übrige Milchsäure an die frei gewordenen Calcium-Ionen gebunden wurde. Warum der Säureabbau nicht noch weiter ging, ob vielleicht unter den obwaltenden Verhältnissen die gebildeten Produkte einen weiteren Abbau verhinderten, vermögen wir nicht anzugeben. Die Versuchsdauer war ausreichend, denn eine etwa 6 Wochen später vorgenommene Untersuchung einer Flasche dieses entsäuerten Clävners mit den 3 Bakterien ergab einen Gesamtsäuregehalt von 3,63‰ Äpfelsäure. Es hat also keine weitere Änderung mehr stattgefunden.

Zur Aussaat benützte man bei diesem Versuch *Micrococcus acidovorax*, den man in üblicher Weise in einem säurearmen Wasserbirnsaft vermehrt hatte. Es wäre nun denkbar, daß der plötzliche Übergang aus einer säurearmen Flüssigkeit in einen säurereichen Wein ungünstig auf die Lebensfähigkeit der Bakterien einwirken könnte und daß aus diesem Grunde *Micrococcus acidovorax* in dem nicht entsäuerten Weine nicht wuchs. Um dies zu prüfen, entnahm man einer Flasche mit teilweise entsäuertem, aber immer noch 6,8‰ Säure aufweisenden Clävner Wein, in dem die Bakterien gut gewachsen waren, Aussaatmaterial des *Micrococcus* und brachte es in nicht entsäuerten Wein. Trotzdem vermochten die Mikrokokken hier nicht zu gedeihen.

In gleicher Weise wie die beiden *Bacterium*-arten (*B. manniopœum* und *B. gracile*) sollte auch die *Micrococcus*-Gruppe auf ihr Verhalten in noch etwas zuckerhaltigen Weinen geprüft werden. Den betreffenden vollständig vergorenen Weinen (aus Clävner- und Gutedeltrauben) wurde noch etwas unvergorener Traubensaft zugefügt (p. 197) und nach der Sterilisation derselben in sorgfältig verkorkten Flaschen hatte man die Bakterien ausgesät. Die mit Gärverschlüssen versehenen Versuchsgefäße blieben dann während 2 Monaten bei 19° stehen. Die Untersuchung ergab die in Tabelle 60 und 61 zusammengestellten Resultate.

Der zum Versuch verwendete ursprüngliche Clävner Wein enthielt pro Liter: 0,86 g Zucker (Invertzucker); 73,36 g Alkohol; 7,61 g

Gesamtsäure (als Äpfelsäure); 0,36 g flüchtige Säure (als Essigsäure); 1,01 g Milchsäure und 24,2 g Extrakt.

Tabelle 60.

	Zucker	Alkohol	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Spätburgunderwein (Clävner) ent- säuert, steril	10,47	67,36	2,94	0,14	2,79	1,57	32,4
Spätburgunderwein, (Clävner) ent- säuert, + <i>Micr. acidov.</i>	1,46	65,72	7,34	0,31	7,00	11,24	29,5
Spätburgunderwein (Clävner) ent- säuert, + <i>Micr. varioc. h</i>	9,92	65,97	1,60	0,17	1,41	2,8	31,1
Spätburgunderwein (Clävner) ent- säuert, + <i>Micr. varioc. m</i>	10,5	66,1	2,19	0,20	1,97	2,34	32,3
Spätburgunderwein (Clävner) ent- säuert, + <i>Micr. varioc. n</i>	10,5	66,5	2,40	0,21	2,17	2,02	31,4
Spätburgunderwein (Clävner) ent- säuert, + <i>Micr. varioc. l</i>	10,2	66,9	2,40	0,18	2,20	1,80	31,9

Schon am 10. Tage war der ursprünglich schön rubinrote glanzhelle Wein mit *Micrococcus acidovorax* stark trüb und schokoladefarbig. Er zeigte zugleich eine starke Gasentwicklung, während zu dieser Zeit die mit dem *Micrococcus variococcus h, l, m* und *n* infizierten Weine noch hell waren und keine Gärung erkennen ließen. Allmählich begann aber auch bei diesen die Bakterientätigkeit, erreichte aber nur geringe Intensität. Die Weine blieben dabei klar und veränderten ihre Farbe nicht wesentlich. Bei den Weinen mit *Micrococcus acidovorax* war die Kohlensäureentwicklung schon vor dem 18. Tage beendet. Dieser Entwicklung entsprechend war auch das Depot in diesem Wein mächtiger als bei den anderen. In allen fanden sich die Mikrokokken in Form von Diplokokken, vereinzelt oder zu Haufen miteinander verklebt; bei *m* und *n* ließen sich noch vereinzelt kleine Zoogloeen erkennen. Zur Zeit der Untersuchung erschien der mit *Micrococcus acidovorax* vergorene Wein stark verändert, in der einen Flasche noch mehr getrübt als in der andern, hellrötlich, ähnlich wie umgeschlagener Wein. Ebenso erinnerte der Geruch an derartig erkrankte Weine. Bei der Kostprobe trat ein stark saurer Geschmack hervor, so daß die anderen Geschmackseigenschaften nicht bemerkbar waren. Die mit *Micrococcus variococcus h, l, m* und *n* infizierten Weine erschienen zur Zeit der Untersuchung klar, in der Farbe kaum verändert und auch der Geruch war ungefähr wie beim ursprünglichen. Im Geschmack dagegen machte sich ein gewisser Säuremangel bemerkbar, namentlich bei *Micrococcus variococcus h*.

Von besonderem Interesse erscheinen uns die von *Micrococcus acidovorax* hervorgerufenen Veränderungen. Wie aus der Tabelle 60 zu ersehen ist, wurde eine auffällig große Menge von Milchsäure erzeugt und nebenbei bemerkt, wiederum äußerst wenig flüchtige Säure. Diese Milchsäure kann nicht ausschließlich von der im Wein ursprünglich vorhandenen Äpfelsäure herkommen, auch wenn wir annehmen, daß neben der freien Äpfel-

säure Salze von solcher vorhanden gewesen wären; denn vor der Entsäuerung besaß der Wein nur 7,61 g Gesamtsäure als Äpfelsäure, die im freien Zustande 5,1 g Milchsäure hätte liefern können. Auch würde die Milchsäure, wenn sie aus äpfelsauren Salzen entstanden wäre, an die beim Abbau dieser Salze freiwerdenden Calcium- usw. Ionen gebunden, also nicht frei sein; sie hätte in diesem Fall den Gesamtsäuregehalt nicht bedeutend erhöhen können. Es muß also eine beträchtliche Menge Milchsäure auch noch aus Zucker entstanden sein, was übrigens durch die Zuckerbestimmung direkt erwiesen wurde. Wieviel Milchsäure aus Zucker und wieviel durch den Abbau von Äpfelsäure entstanden ist, läßt sich auf Grund der festgestellten Ergebnisse nicht genau berechnen. Nach früheren Versuchen (Tabelle 51, p. 257) dürfen wir wohl annehmen, daß unter solchen Verhältnissen im Anfang hauptsächlich die Säure abgebaut und erst im späteren Verlauf der Zucker angegriffen wird; so wäre es denn ganz gut möglich, daß dieser Wein durch *Micrococcus acidovorax* infolge Abbau von Äpfelsäure bzw. sauren äpfelsauren Salzen anfänglich fast ganz entsäuert wurde und daß erst hernach durch die Bildung von Milchsäure aus Zucker wieder eine Zunahme des Gesamtsäuregehaltes stattfand. In jenem Stadium der fast vollständigen Entsäuerung ist dann möglicherweise die schokoladebraune Trübung und Entfärbung des Weines eingetreten. Die Abnahme des Extraktes ist weitaus geringer als die des Zuckers. Der durch den Zuckerabbau verursachte Extraktverlust wird eben durch die an seine Stelle tretende (nicht flüchtige) Milchsäure ausgeglichen.

Von den übrigen Mikrokokken hat nur *Micrococcus variococcus h* einen nennenswerten Säureabbau verursacht (um 1,34‰ Äpfelsäure) und etwas Milchsäure gebildet; bei m, n und l waren die Umsetzungen noch geringer.

Der zu einem ähnlichen Versuche benutzte Gutedelwein war mit Reihefe vergoren und erhielt durch Zusatz von unvergorenem Gutedelsaft einen Zuckergehalt von 17,5‰ (Invertzucker). Ursprünglich enthielt er pro Liter: 1,69 g Zucker (Invertzucker); 90,04 g Alkohol; 6,00 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure); 0,32 g flüchtige Säure (als Essigsäure) und 16,9 g Extrakt.

Tabelle 61.

	Zucker	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Gutedelwein, entsäuert, steril	17,5	2,06	0,26	1,77	1,12	29,9
„ „ + <i>Micr. acidov.</i>	13,5	4,16	0,38	3,74	4,50	27,6
„ „ + <i>Micr. varioc. h</i>	17,4	1,73	0,31	1,39	0,90	29,5
„ „ + <i>Micr. varioc. n</i>	16,87	1,87	0,31	1,53	0,90	29,4

Auch in diesem Gutedelwein wuchs *Micrococcus acidovorax* besser als *Micrococcus variococcus h* und n. Schon am 10. Tage zeigte sich der betreffende Wein mit *Micrococcus acidovorax* trüb und mit geringer Gasentwicklung, während die Weine mit den letztgenannten Bakterien noch hell waren. Die Trübung hielt an bis zur Zeit der Untersuchung; ein großer Teil der Bakterien hatte sich aber doch in

Form eines ringförmigen, ziemlich starken Depots zu Boden gesetzt. In den Flaschen mit *Micrococcus variococcus* h und n, die klar blieben, bildete sich nur ein schwaches Depot, besonders bei n. Der Wein mit *Micrococcus acidovorax* erschien heller in der Farbe als ursprünglich und zeigte einen auffallend scharf sauren, jedoch nicht stichigen, aber sonst unangenehmen Geschmack, während die beiden anderen weder in Farbe noch Geruch und Geschmack sich verändert erwiesen. Die Menge der Gesamtsäure (4,16‰) bei *Micrococcus acidovorax* sollte eigentlich den Wein nicht so stark sauer erscheinen lassen, zumal, da es sich größtenteils um Milchsäure handelt. Allein der geringe Gehalt an sonstigen zuckerfreien Extraktstoffen läßt hier wohl die Säure mehr als in sonstigen Weinen hervortreten. In allen 3 Versuchsflüssigkeiten fanden sich Diplokokken in großer Zahl, bei *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* n außerdem Tetraden; es unterscheiden sich also die beiden Rassen des *Micrococcus variococcus* auch in dieser Beziehung.

Von den 3 Mikrokokken hat wiederum *Micrococcus acidovorax* allein eine stärkere Umsetzung im Wein verursacht; die im umgesetzten Wein vorhandene Milchsäure (4,5 g = 3,3 g als Äpfelsäure) findet sich wohl zum größten Teil im freien Zustande, was auch aus der Zunahme der Gesamtsäure hervorgeht. Bei der starken Entsäuerung des Weines durch kohlen sauren Kalk wird voraussichtlich ein großer Teil der Weinsäure ausgefällt und Äpfelsäure in äpfelsaure Salze übergeführt werden. Wäre nun durch die Bakterien diese gebundene Äpfelsäure abgebaut worden, so würde durch die frei werdenden Calcium-Ionen Milchsäure gebunden worden sein, was nicht der Fall war. Man kommt eher zu dem Schluß, daß hier keine oder jedenfalls nur wenig Säure abgebaut, hingegen Zucker umgesetzt wurde. In der Tat hat der Zucker um 4 g abgenommen, was ausreichend ist, um die Menge der neugebildeten Milchsäure zu erklären. Es könnte auffallend erscheinen, daß *Micrococcus acidovorax* hier nicht imstande war, die Säure bzw. deren Salze abzubauen. Allein wie aus Tabelle 41, p. 233 zu ersehen ist, war auch *Bacterium gracile*, das sonst so energisch die Säure abbaut, in diesem Wein hierzu ebenfalls nicht imstande. Man kommt daher zu der Annahme, daß die Säure zum größten Teil anderer Art war, vielleicht aus Weinsäure bestand.

Die chemisch nachgewiesenen Umsetzungen durch *Micrococcus variococcus* h und n sind ganz unbedeutend und es wird durch diesen Versuch die Verschiedenheit dieser Art von *Micrococcus acidovorax* aufs Neue dargetan.

Hier möge ein Versuch angeführt werden, der bei *Bacterium manitopœum* und *Bacterium gracile* nicht angestellt wurde und bezweckte, das Verhalten von *Micrococcus acidovorax* gegenüber verschiedenen Mengen Äpfelsäure bei Gegenwart von Zucker in einem noch nicht ganz vergorenen Wein festzustellen. Es wurde dazu ein Spätburgunder (Clävner) Wein verwendet, der ursprünglich pro Liter 67,9 g Alkohol und 8 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure) enthielt. Von diesem Wein wurde ein Teil stark, ein zweiter mittelmäßig, ein dritter schwach entsäuert und jeweils einer Portion ca. 14‰ chemisch reine Lävulose zugesetzt. Nach üblicher Sterilisation dieser Weine wurden die Versuchsflaschen mit *Micrococcus acidovorax* geimpft und, mit Gärverschlüssen versehen, in den Brutraum von 19° gestellt. Versuchsdauer: 7 Wochen.

Schon 8 Tage nach der Infektion beobachtete man bei den stark und mittelmäßig entsäuerten Weinen, bei letzteren etwas weniger, Gasentwicklung, während in dem schwach entsäuerten die Bakterien noch keine Umsetzungen erkennen ließen. Am 12. Tage erschienen die stark entsäuerten ohne Lävulose klar; beim Schütteln wurden sie vom Depot jedoch trüb, braunrot. Die Bakterientätigkeit war schon beendet. Im Wein mit Lävulose hatten sich die Bakterien noch nicht abgesetzt. Der trübe braunrote Wein entwickelte noch ziemlich viel Kohlensäure. Beim mittelmäßig entsäuerten Wein war auch ohne Lävulose die Bakterientätigkeit noch nicht beendet, was an der lebhaften Gasentwicklung zu erkennen war. In noch stärkerer Tätigkeit befanden sich die Bakterien in diesem Wein mit Lävulosezusatz, der jetzt trüb war und eine braunrot durchscheinende Färbung zeigte. Erst zuletzt begann die Gärtätigkeit der Bakterien in dem schwach entsäuerten Wein.

Die stark entsäuerten Versuchsweine zeigten zunächst eine schön rubinrote Färbung, die jedoch bei längerem Stehenlassen der geöffneten Flaschen, wohl infolge des Luftinflusses, verändert wurde; der Wein wurde trüb, kaffeebraun und bildete ein Depot. Diese Veränderung trat aber beim schwach entsäuerten Wein nicht ein, was auf die bekannte Tatsache hinweist, daß ein gewisser Säuregehalt für die Erhaltung des Rotweinfarbstoffes notwendig ist. Es leuchtet nun ein, daß diese Veränderung des Farbstoffes auch vor sich gehen kann, wenn die Säureabnahme infolge einer Säuregärung sich einstellt. Wird durch die Bakterien z. B. durch Umsetzung von Zucker der Säuregehalt eines vorher in der Säure abgebauten Weines wieder erhöht, so kann auch der Farbenton sich wieder etwas verbessern. In den Depots fanden sich freilebende Mikrokokken in Form von Diplokokken und Tetraden, in dem schwach und stark entsäuerten auch Zoogloeen. Die chemischen Veränderungen sind aus der Tabelle 62 (folg. Seite) zu ersehen.

In den verschiedenen entsäuerten Weinen wurde durch *Micrococcus acidovorax* überall viel Milchsäure gebildet und zwar da, wo Lävulose vorhanden war, in vermehrtem Maße. Der Gehalt an flüchtiger Säure wurde dagegen nicht nennenswert vermehrt.

Bei dem stark entsäuerten Wein ohne Lävulose muß die neugebildete Milchsäure (ca. 3⁰/₁₀₀) aus Äpfelsäure entstanden sein und zwar aus äpfelsauren Salzen. Neugebildet wurden ca. 3 g Milchsäure, was ca. 4,4 g abgebauter Äpfelsäure entspricht. Nun beträgt aber die ursprüngliche nicht flüchtige Säure nur 1,47 g oder 2,94 g Äpfelsäure in Form von saurem äpfelsauren Calcium. Es muß daher noch etwas Äpfelsäure in anderer Form abgebaut worden sein, vielleicht als neutrales äpfelsaures Kalium. Wenn nun die Äpfelsäure aus Salzen abgebaut wurde, so wird dadurch auch die Tatsache erklärt, daß sich die entstandene Milchsäure nicht in freiem, sondern in gebundenem Zustande vorfindet. Der Wein war fast neutral.

Bei dem mittelmäßig entsäuerten Wein ohne Lävulose entspricht die neugebildete Milchsäure $4,36 - 1,34 = 3,02$ g 4,4 g abgebauter Äpfelsäure. Nun betrug aber die anfängliche Menge nicht flüchtiger Säure 3,45 g, worunter auch schon Milchsäure, Bernsteinsäure usw. sich befinden. Es könnte also diese Säure, als freie Säure angesehen, nicht ausreichen zur Bildung der bezeichneten Menge gebildeter Milchsäure. Das führt zu der Annahme, daß in diesem Wein freie Äpfelsäure und gebundene abgebaut wurden und zwar voraussichtlich die freie zuerst, und dann von der gebundenen noch ein Teil. Das geht auch aus dem Zustand der Milch-

säure hervor, von der ca. $\frac{3}{5}$ in gebundener Form sich vorfindet. Das Verhältnis ist also ein anderes als im stark entsäuerten Wein, wo anfänglich keine freie Säure sich vorfand, daher nur gebundene Äpfelsäure abgebaut werden konnte und dementsprechend sich dann alle entstandene Milchsäure in gebundenem Zustand vorfand.

Tabelle 62.

	Zucker als Invertzucker g im l	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Spätburgunder (Clävnerwein), stark entsäuert, mit Lävulose, steril	13,14	1,8	0,30	1,47	1,44
Spätburgunder (Clävnerwein), stark entsäuert, ohne Lävulose, + Micr. acidov.	—	0,40	0,23	0,15	4,50
Spätburgunder (Clävnerwein), stark entsäuert, mit Lävulose, + Micr. acidov.	4,97	5,22	0,42	4,76	6,62
Spätburgunder (Clävner), mittelm. entsäuert, mit Lävulose, steril	14,45	3,88	0,39	3,45	1,34
Spätburgunder (Clävner), mittelm. entsäuert, ohne Lävulose, + Micr. acidov.	—	1,67	0,39	1,24	4,36
Spätburgunder (Clävner), mittelm. entsäuert, mit Lävulose + Micr. acidov.	8,75	5,22	0,37	4,82	7,42
Spätburgunder (Clävner), wenig entsäuert, mit Lävulose, steril	13,54	6,90	0,39	6,47	1,14
Spätburgunder (Clävner), wenig entsäuert, ohne Lävulose, + Micr. acidov.	—	4,08	0,46	3,57	4,94
Spätburgunder (Clävner), wenig entsäuert, mit Lävulose, + Micr. acidov.	8,91	7,17	0,47	6,65	7,74

Die in dem wenig entsäuerten Wein ohne Lävulose entstandene Milchsäure, 3,8 g, entspricht, in Äpfelsäure umgerechnet, 2,8 g. Zur Bildung von 3,8 g Milchsäure waren mindestens 5,6 g Äpfelsäure erforderlich. Der Gehalt an Gesamtsäure sowohl als auch der an nicht flüchtiger Säure haben nun aber ungefähr um die Differenz $5,6 - 3,8 = 2,8$ g (als Äpfelsäure) = 2,8 g abgenommen. Daraus läßt sich schließen, daß die Milchsäure aus freier Äpfelsäure entstanden sein muß. Es ist dies auch begreiflich, da in diesem wenig entsäuerten Wein bedeutend mehr freie Äpfelsäure sich vorfand als in dem mittelmäßig entsäuerten oder gar dem stark entsäuerten.

In den Weinen mit Lävulose wurde nicht nur Säure abgebaut, sondern auch ein Teil des Zuckers zersetzt und zwar in dem stark entsäuerten 8,1 g, bei dem mittelmäßig entsäuerten 5,7 g und bei dem schwach entsäuerten 4,6 g.

Im stark entsäuerten Wein mit Lävulose findet sich die Milchsäure fast ganz in freiem Zustande; es ist also keine oder wenig gebundene Äpfelsäure abgebaut worden und da sich in diesem Wein keine freie Äpfelsäure ursprünglich mehr vorfand, so ist hier die gebildete Milchsäure ein Produkt des Zuckerabbaues. Der Micrococcus hat also hier der Lävulose den Vorzug vor der gebundenen Äpfelsäure gegeben; in dem gleichen Wein ohne Lävulose hat er dagegen in Ermangelung solcher die gebundene Äpfelsäure abgebaut.

Bei dem mittelmäßig entsäuerten Wein mit Lävulose liegen die Verhältnisse ähnlich. Auch hier ist fast alle Milchsäure frei und es darf wohl geschlossen werden, daß sie entstanden ist durch Abbau von freier Säure und Zucker, und zwar wurde hier, weil etwas mehr freie Säure vorhanden war, weniger Zucker zersetzt.

Noch ausgeprägter zeigt sich dieses Verhältnis bei dem schwach entsäuerten Wein mit Lävulose. Hier übertrifft der Gehalt an nicht flüchtiger Säure denjenigen an gefundener Milchsäure (beide als Äpfelsäure berechnet). Die nicht flüchtige Säure enthält hier eben noch Äpfelsäure, Bernsteinsäure usw. Da dem *Micrococcus* hier verhältnismäßig viel freie Äpfelsäure zur Verfügung stand, wurde noch weniger Zucker abgebaut. Für eine weitere Zersetzung wäre noch Lävulose zur Verfügung gestanden, allein es scheint, daß der erreichte Säuregrad eine weitere Bakterientätigkeit nicht mehr gestattete. Zwischen 6,56 und 9,65‰ Äpfelsäure stellt *Micrococcus acidovorax* nach unseren Untersuchungen die Gärstätigkeit ein. Hier ist allerdings der Stillstand durch Milchsäure herbeigeführt worden, doch dürften die Grenzwerte nicht stark abweichend von denen der Äpfelsäure sein. — Diese Versuche mit einem verschieden stark entsäuerten Wein stimmen in ihren Ergebnissen in schöner Weise überein mit einem ähnlichen Versuch mit *Micrococcus acidovorax* in Hefeauszug, dem 12‰ Lävulose und verschiedene Mengen Äpfelsäure zugefügt wurden (Tabelle 48, p. 250).

Bei Gegenwart von Weintrub (abgesetzte Hefe usw.) baut, wie bereits erwähnt, nach einer Angabe von Seifert *Micrococcus malolacticus* die Säure weiter ab, als ohne Trub. Um diese Frage auch für unseren *Micrococcus acidovorax* zu entscheiden, haben wir ihn einem ähnlichen Versuche unterzogen, wie er für *Bacterium manitopæum* (p. 200) und für *Bacterium gracile* (p. 234) bereits beschrieben wurde. Es kamen dabei 2 Weißweine, ein mit Reinhefe vergorener Gutedelwein und ein gleichbehandelter Räuschlingwein zur Verwendung, teils direkt, teils in entsäuertem Zustand. Näheres bezüglich Versuchsanstellung siehe p. 200.

Tabelle 63.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Gutedelwein (entsäuert), vor der Infektion	3,38	1,13	2,14	—
„ „ ohne Hefe + <i>Micr. acidov.</i>	3,60	1,06	2,44	3,64
„ „ ohne Hefe (steril.) + <i>Micr. acidov.</i>	3,60	1,04	2,46	3,64
„ „ mit Hefe (lebend) + <i>Micr. acidov.</i>	2,60	0,94	1,57	2,46
„ (nicht entsäuert), vor der Infektion	7,07	1,10	5,86	—
„ „ mit Hefe (steril.) + <i>Micr. acidov.</i>	7,07	1,25	5,70	0,36
„ „ mit Hefe (lebend) + <i>Micr. acidov.</i>	6,54	0,92	5,53	0,60

Der Alkohol des ursprünglichen Gutedelweines betrug pro Liter: 80 g, die Gesamtsäure 7,04 g (als Äpfelsäure); die flüchtige Säure 1,10 g als Essigsäure. Dauer des Versuches 10 Monate. Temperatur 19°.

Im nicht entsäuerten Wein vermochte *Micrococcus acidovorax* sich nicht zu entwickeln, wohl aber in dem Weine, dessen Säuregehalt durch kohlen sauren Kalk herabgesetzt worden war. Hier zeigte sich jedoch kein großer Unterschied, ob sich die Bakterien allein oder mit Hefetrub zusammen fanden. Ein unzweifelhaft fördernder Einfluß, wie ihn Seifert und auch Koch angeben, kam hier nicht zur Geltung.

Die Resultate des in gleicher Weise mit Räuschlingwein angestellten Versuches finden sich in Tabelle 64.

Tabelle 64.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l
Räuschlingwein (ents.), vor der Infektion	5,61	0,46	5,11	0,92
„ „ ohne Hefe + Micr. acidov.	3,54	0,59	2,89	4,54
„ „ mit Hefe (seril.) + Micr. acidov.	3,67	0,64	2,97	5,16
„ „ mit Hefe (lebend) + Micr. acidov.	3,33	0,59	2,69	5,00
Räuschlingwein (nicht ents.), vor der Infektion	8,60	0,46	8,10	0,92
„ „ mit Hefe (sterilisiert) + Micr. acidov.	8,54	0,40	8,10	0,72

Auch hier wuchs *Micrococcus acidovorax* nur in dem teilweise entsäuerten Wein. Die Anwesenheit von Hefetrub vermochte hier, nach der Menge neugebildeter Milchsäure zu schließen, eine, wenn auch schwache, Förderung der Säuregärung zu verursachen.

Es wurde auch versucht, durch *Micrococcus acidovorax* in einem säurereichen Apfelwein den Säureabbau herbeizuführen. In einem Apfelwein (aus Weinäpfeln), in dem *Bacterium gracile* den ursprünglichen Säuregehalt von 12,06 auf 6,09 g (als Äpfelsäure berechnet) pro Liter herabgesetzt hatte, vermochte *Micrococcus acidovorax* selbst im Laufe eines Jahres keine Umsetzungen hervorzurufen.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes lassen sich kurz folgendermaßen zusammenfassen:

In Weinen und Obstweinen, die einen höheren Säuregehalt besitzen, vermag *Micrococcus acidovorax* nicht zu wachsen; in teilweise entsäuerten Weinen ohne Zucker baut er freie Säure und eventuell auch gebundene Säure ab unter Bildung von verhältnismäßig viel Milchsäure und stets wenig oder gar keiner flüchtigen Säure. Die hierbei entstehende Milchsäure findet sich in gebundenem oder freiem Zustande vor, je nachdem äpfelsaure Salze oder freie Äpfelsäure abgebaut wurde. Bei stark entsäuerten Weinen, wo die äpfelsauren Salze vorherrschen, findet sich nach der Bakterieneinwirkung die Milchsäure zu einem großen Teil oder ganz gebunden; in schwach entsäuerten Weinen wird dagegen die gebildete Milchsäure zum größten Teil in freiem Zustande vorhanden sein. Im ersteren Falle findet trotz starker Milchsäurebildung eine

starke Säureabnahme statt, im letzteren Falle dagegen ist die Säureabnahme geringer. Enthalten entsäuerte Weine noch Zucker, so wird neben der Äpfelsäure auch noch ein Teil des Zuckers abgebaut, und zwar je nach dem Grad der Entsäuerung mehr oder weniger; bei starker Entsäuerung, wo den Bakterien weniger Säure und diese nur in gebundener Form zur Verfügung steht, wird der Zucker stärker angegriffen als bei schwacher Entsäuerung, in welchem Falle mehr freie Äpfelsäure vorhanden ist. Wo in den verschiedenen Weinen auch *Micrococcus variococcus* ausgesäet wurde, zeigte sich auch hier wieder geringeres Wachstum und die geringere Fähigkeit dieser Bakterien, Äpfelsäure oder deren Salze abzubauen. Die Anwesenheit von Hefetrub hatte bei unseren Versuchen gar keinen oder nur einen geringen fördernden Einfluß auf die Entwicklung der Mikrokokken.

IV.

Diagnose und systematische Stellung der untersuchten vier Bakterienarten.

Bacterium mannitopæum Müller-Thurgau findet sich in großer Menge in milchsäurestichigen Obst- und Traubenweinen. Bildet Kurzstäbchen und kürzere oder längere septierte und nicht septierte Fäden. Die Kurzstäbchen sind an den Enden abgerundet, 1,5 μ lang und variieren im Durchmesser zwischen 0,7 und 1,3 μ , selten unter 0,7 und über 1,3 μ breit. Die Einzelstäbchen zeigen keine Eigenbewegung und bilden keine Sporen. In Säften und Weinen bildet das Bacterium oft größere, aus langen vielfach ineinander verschlungenen Fäden bestehende Flocken. In Weinen gewisser Beschaffenheit werden Zoogloeen oft in großer Zahl gebildet, kugelige Gebilde, in denen die oft nicht mehr deutlich unterscheidbaren Einzelbakterien durch eine Zwischensubstanz fest miteinander verbunden sind. Diese Zoogloeen können zu Bakterienblasen werden.

Verflüssigt die Gelatine nicht. Tiefenkolonien in der Gelatine von kugelig rundlicher Gestalt, glatt; Oberflächenkolonien rundlich, am Rande stark gelappt, Gramsche Färbung positiv. Fakultativ anaërob. Vergärt Lävulose, Dextrose und Galaktose energisch unter Bildung von viel Milchsäure, Essigsäure, Kohlensäure, sodann bei Lävulose von Mannit, bei den beiden anderen von Äthylalkohol. Vergärt ferner Saccharose, Maltose, Raffinose, l-Arabinose, Xylose, α -Methylglukosid und Amygdalin, dagegen nicht Laktose, Rhamnose, Phloridzin, Mannit, Dextrin und Pepton. Baut die Äpfelsäure ab, aber nur langsam, Zitronensäure in geringen Mengen, ziemlich energisch saures äpfelsaures Calcium, nicht dagegen neutrales äpfelsaures Kalium, äpfelsaures Ammonium, Weinsäure und deren Salze, Bernsteinsäure und Milchsäure. Temperatur-Optimum zwischen 26° und 34°. Bildet Rassen, die sich unterscheiden im Durchmesser der Bakterien und in der Energie der Milchsäure- und Mannitgärung.

Bacterium gracile Müller-Thurgau findet sich in milchsäurestichigen Weinen und Obstweinen, sowie in solchen, die einen Säureabbau erlitten haben. Bildet Kurzstäbchen, kürzere und längere, vielfach scharf geknickte septierte Fäden. Länge der Kurzstäbchen 0,75—1 μ ; Durchmesser ziemlich konstant 0,5 μ . Keine Sporen und keine Eigenbewegung.

Tabelle

Tabellarische Zusammenstellung der morphologischen
säure-

	Bacterium mannitopœum Müller-Thurgau	Bacterium gracile Müller-Thurgau	Micrococcus acidovorax nov. spec.
1. Fundort	aus milchsäure- stichigem Obst- wein und Weiß- wein	aus im Abbau be- griffenen Wei- nen und Obst- weinen	aus einem Obst- wein
2. Wachstum in Trau- ben- und Obstsäften			
a) Zellform	Kurzstäbchen, kürzere und lange septierte u. nicht sep- tierte Fäden	Kurzstäbchen, kurze und län- gere, scharf ge- knickte sept- ierte Fäden, selten Flocken	runde Einzel- kokken, Diplo- kokken, Tetra- den
b) Länge der Kurzstäbchen	1,5 μ	0,75—1,0 μ	—
c) Dicke der Kurzstäbchen oder der Kokken	0,7—1,3 μ selten unter 0,7 oder über 1,3	0,5 μ	0,5—0,7 μ
d) Wachstumsformen	Flocken, Zoo- gloeen, Blasen	selten Flocken. Zoogloeen, Blasen	Zoogloeen, Bla- sen
3. Wachstum in Gelatine			
a) Zellform	Kurzstäbchen, ausnahmsweise Fäden	Kurzstäbchen, hier und da kurze geknick- te, sept. Fäden	Einzelkokken, Diplokokken u. Tetraden
b) Länge der Kurzstäbchen	1,5 μ	0,75 μ	—
c) Dicke der Kurzstäbchen	0,75—1,5 μ	0,4—0,5 μ	0,5—0,7 μ
d) Wachstumsformen			
Oberflächenkolonien	Rundlich, Rand ausgebuchtet, gewellt.	nierenförmig, ganzrandig	—
Tiefenkolonien	Rundlich, glatt deutlich weißer, dichter Strich	Rund, glatt zarter, durch- scheinender, opa- lisierender Strich	Rund, glatt zarter Strich
Stichkultur	im Stich gut	im Stich gut	im Stich gut
e) Verflüssigung der Gelatine	verflüssigt nicht	verflüssigt nicht	verflüssigt nicht
4. Gramsche Färbung	positiv	positiv	positiv
5. Sporenbildung	bildet keine Spo- ren	keine Sporen	keine Sporen
6. Bewegungsfähigkeit	zeigt keine Be- wegung	keine Bewegung	keine Bewegung
7. Sauerstoffbedürfnis	fakultativ anaë- rob	fakultativ anaë- rob	fakultativ anaë- rob

65.

Merkmale der untersuchten und einiger anderer Milchbakterien.

<i>Micrococcus variococcus</i> nov. spec.	Mannitferment von Gayon und Dubourg	<i>Micrococcus malolacticus</i> Seifert	<i>Saccharobac. pastor</i> var. berol. Henneberg	<i>Pediococcus acidilactici</i> Lindner
aus einem Rotwein mit Säureabbau u. einem linden Weißwein, u. einem milchsäurestichigen Weißwein, dem Obstwein zugesetzt worden war	aus einem algierischen Wein	aus Weintrub (Rotgipfler)	aus Berliner Weißbier	aus Biermaische
runde Einzelkokken, Diplokokken, Tetraden	kürzere und längere Fäden	Diplokokken und hie und da Tetraden	gebogene Zellfäden	Einzelkokken, Ketten und Tetraden
—	—	—	—	—
0,7—1,5 μ	—	1,0 μ	0,7—1,0 μ	0,8—1,0 μ
selten Zoogloeen	Anhäufungen (Zoogloeen?)	—	—	—
Einzelkokken, Diplokokken und Tetraden	—	—	in Agar: gebogene Zellfäden	Einzelkokken, Diplokokken in Ketten oder Tetraden
—	—	—	—	—
0,7—1,5 μ	—	—	1,2 μ	0,8—1,0 μ
nierenförmig, ganzrandig	—	gebuchtet, gelappt	—	—
rund, glatt sehr zarter Strich	— —	— —	— —	— Wachstum gut in Agar
im Stich gut	—	—	—	Wachstum gut in Agar
verflüssigt nicht positiv	— —	verflüssigt nicht —	— —	— —
keine Sporen	—	—	keine Sporen	keine Sporen
keine Bewegung	—	—	keine Bewegung	keine Bewegung
fakultativ anaërob	fakultativ anaërob	fakultativ anaërob	—	—

Bildet selten und dann nur kleinere Flocken, d. h. kleinere Knäuel ineinander verschlungener Fäden, ferner Zoogloeen (kugelige Gebilde aus zahlreichen durch eine Zwischensubstanz verbundenen, oft nicht mehr deutlich unterscheidbaren Einzelbakterien) und Bakterienblasen.

Verflüssigt die Gelatine nicht. Tiefenkolonien in der Gelatine kugelig, glatt. Oberflächenkolonien ganzrandig. Gramsche Färbung positiv. Fakultativ anaërob. Vergärt Lävulose, Dextrose und Galaktose unter Bildung von viel Milchsäure, Essigsäure, Kohlensäure, bildet sodann bei Lävulose Mannit bei den beiden anderen Äthylalkohol. Vergärt nicht Saccharose, Laktose, Maltose, Raffinose, l-Arabinose, Xylose, Rhamnose, Phloridzin, Mannit, Dextrin und Pepton Witte, wohl aber α -Methylglukosid und etwas Amygdalin. Zersetzt energisch Äpfelsäure, Zitronensäure und äpfelsaures Calcium, etwas weniger lebhaft neutrales äpfelsaures Kalium und äpfelsaures Ammonium. Weinsäure und ihre Salze werden nicht angegriffen, ebenso nicht Bernsteinsäure und Milchsäure. Temperatur-Optimum zwischen 22° und 26°. Bildet Rassen, die sich weniger durch die Dimensionen der Stäbchen als durch die Energie der Gärung unterscheiden.

Micrococcus acidovorax nov. spec. findet sich in Weinen mit Säureabbau, auch als Mischinfektion bei kranken Weinen. Bildet Einzelkokken, Diplokokken und Tetraden (Merismopödien-Täfelchen). Einzelkokken 0,5—0,7 μ Durchmesser. Bildet in Weinen gewisser Beschaffenheit Zoogloeen (kugelige Vereinigungen von Kokken, in denen diese oft nur noch undeutlich voneinander unterscheidbar sind und durch eine dichte Zwischensubstanz zusammengehalten werden) und Bakterienblasen. Die Kokken zeigen keine Eigenbewegung und bilden keine Sporen.

Verflüssigt die Gelatine nicht. Tiefenkolonien in Gelatine von kugeliger Gestalt, glatt. Oberflächenkolonien rundlich, ganzrandig. Gramsche Färbung positiv. Fakultativ anaërob. Reiner Milchsäuregärer, zersetzt Dextrose, Lävulose, Galaktose, Laktose und Maltose unter Bildung von viel Milchsäure ohne Nebenprodukte wie Essigsäure und Kohlensäure usw. Vergärt nicht Saccharose, Raffinose, l-Arabinose, Xylose, Rhamnose, α -Methylglukosid, Amygdalin, Phloridzin, Mannit, Dextrose und Pepton Witte. Zersetzt lebhaft Äpfelsäure unter Bildung von Milchsäure und Kohlensäure, ebenso neutrales äpfelsaures Kalium, saures äpfelsaures Calcium, neutrales äpfelsaures Ammonium. Vergärt nicht Weinsäure und deren Salze, Zitronensäure, Bernsteinsäure und Milchsäure. Temperatur-Optimum 26,5°.

Micrococcus variococcus nov. spec. findet sich z. B. in Rot- und Weißweinen, die im Säureabbau („siedende Weine“) begriffen sind. Bildet Einzelkokken, Diplokokken, Tetraden (Merismopödien-Täfelchen). Durchmesser der Einzelkokken variiert stark von 0,7—1,5 μ . Bildet in Weinen gewisser Beschaffenheit Zoogloeen (kugelige Vereinigungen von Kokken, die durch eine Zwischensubstanz verbunden und oft nicht mehr deutlich voneinander zu unterscheiden sind). Die Kokken zeigen keine Eigenbewegung und bilden keine Sporen.

Verflüssigt die Gelatine nicht. Tiefenkolonien in der Gelatine kugelig, glatt; Oberflächenkolonien ganzrandig. Gramsche Färbung positiv. — Fakultativ anaërob. Reiner Milchsäuregärer, wirkt schwächer als *Micrococcus acidovorax*, zersetzt Lävulose, Dextrose, Galaktose unter Bildung von Milchsäure ohne Nebenprodukte wie Essigsäure und Kohlensäure usw. Vergärt nicht Saccharose, Laktose, Maltose, Raffinose, l-Arabinose, Xylose, Rhamnose, Phloridzin, Mannit, Dextrin und Pepton Witte, wohl aber α -Me-

Tabelle 66.

Tabellarische Zusammenstellung der physiologischen Eigenschaften der untersuchten und einiger anderer Milchsäurebakterien.

	Bact. man- nitopceum Müller- Thurgau	Bacterium gracile Müller- Thurgau	Micrococcus acidovorax nov. spec.	Micrococcus variococcus nov. spec.	Mannitfermt. von Gayon & Dubourg	Micrococcus malolacticus Seifert	Saccharo- bac. past. var. berol. Henneberg	Pediococcus acidilactici Lindner
erhalten gegenüber:								
extrose	3	3	3	2	+	+	+	+
xylose	3	3	3	2	+	0	+	+
laktose	3	2	3	2	+	+	+	+
melcharose	3	0	?	?	+	+	+	0
aktose	?	0	2	0	+	+	0	+
altose	3	0	3	?	+	+	+	0
stfinose	3	0	0	0	+	+	0	0
Arabinose	3	0	0	0	0	+	+	+
xylose	3	0	0	0	+			
hamnose (Isodulcit) .	0	0	0	0				
Methylglukosid . . .	3	3	0	1			0	0
nygdalin	2	1	0	3	0			
chloridzin	0	0	0	0				
mannit	0	?	?	?	0		0	0
extrin	0	0	0	0	0			
pton Witte	0	0	0	0				
pfelsäure	1	3	3	3	0	+		
einsäure	0	0	0	0	0	0		
tronensäure	1	3	0	0	0	0		
arnsteinsäure	0	0	0	0	0	0		
ilchsäure	0	0	0	0	0	0		
aliummalat, neutral .	0	2	3	2				
mmoniummalat, neutr.	0	1	1	1				
alciummalat, saures .	2	3	3	3				
pfelsaures Äthyl . .	1	2	2	2				
aliumtartrat, saures .	0	0	0	0				
aliumtartrat, neutral.	0	0	0	0				
mmoniumtartrat, neu- trales	0	0	0	0				
bere Alkoholgrenze für das Wachstum . . .	nahe bei 11% Gew.	nahe bei 7,66 Gew. %	nahe bei 11 Gew. %	nahe bei 8 Gew. %				
here Säuregrenze (Äpfel- säure) für das Wachs- tum	nahe bei 9,65°/oo	nahe bei 15°/oo	unter 9°/oo	unter 9°/oo				
temperatur Optimum:								
a) für Säuregeschwin- digkeit	zwischen 26° u. 34,5°	zwischen 22° u. 26°	bei 26,5°	bei 26,5°	35°	25—34°	20—24°	38°
b) für Säuregrad . .	zwischen 18,5° u. 22,5°	zwischen 18,5° u. 26,5°	bei 26,5°	bei 26,5°				

Erklärung der Zeichen: 3 = starke Gärung,
 2 = mäßig starke Gärung,
 1 = schwache Gärung,
 0 = keine Gärung,
 ? = Gärung in zweifelhaften Spuren,
 + = bedeutet, daß in den betreffenden Lösungen eine Gärung stattfand.

Tabelle 67.
Tabellarische Übersicht der Gährprodukte der untersuchten Milchsäurebakterien.

	Bacterium mannitolpocum					Bacterium gracile					Micrococcus acidovorax			Micrococcus variococcus		
	Milch-säure	Essig-säure	Kohlensäure	Alkohol	Mannit	Milch-säure	Essig-säure	Kohlensäure	Alkohol	Mannit	Milch-säure	Essig-säure	Kohlensäure	Milch-säure	Essig-säure	Kohlensäure
Lävulose	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Dextrose	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Galaktose	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Laktose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Maltose	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Raffinose	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Arabinose	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Xylose	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
α-Methylglukosid	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Amygdalin ¹⁾	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	sehr wenig	0	+	sehr wenig	0
Äpfelsäure	+	0	+	+	+	+	sehr wenig	+	+	+	+	0	+	+	0	+
Zitronensäure	+	+	+	+	+	+	sehr wenig	+	+	+	+	0	+	+	0	+
Äpfels. Kal. neutr.	+	+	+	+	+	+	sehr wenig	+	+	+	+	0	+	+	0	+
Äpfels. Ammon. neutr.	+	+	+	+	+	+	sehr wenig	+	+	+	+	0	+	+	0	+
Äpfels. Calc. saures	+	+	+	+	+	+	sehr wenig	+	+	+	+	0	+	+	0	+
Äpfels. Äthyl	+	+	+	+	+	+	sehr wenig	+	+	+	+	0	+	+	0	+

Erklärung der Zeichen: + bedeutet, daß die betreffende Verbindung nachgewiesen wurde.

0 bedeutet, daß die betreffende Substanz bei der Bestimmung nicht nachgewiesen werden konnte.

— bedeutet, daß man die Lösung, in der die Bakterien gewachsen waren, nicht auf die betreffende Substanz hin untersuchte.

* bedeutet, daß in den betreffenden Lösungen kein Wachstum und keine Gärung der Bakterien stattfand.

¹⁾ Liefert außerdem: Bittermandelöl und Blausäure.

thylglukosid und ausgiebig Amygdalin, dieses unter Bildung von Bittermandelöl. Vergärt lebhaft Äpfelsäure, neutrales äpfelsaures Kalium und Ammonium, saures äpfelsaures Calcium, nicht dagegen Weinsäure und ihre Verbindungen, Zitronensäure, Bernsteinsäure und Milchsäure. Temperatur-Optimum bei 26,5°. Bildet Rassen, die sich in der Gärungsenergie etwas unterscheiden.

Bei der großen Unsicherheit, die in der systematischen Gruppierung zurzeit noch besteht, ist es schwierig, die von uns beschriebenen Bakterien an richtiger Stelle im System einzuordnen. Sicher gehören alle 4 zu den Milchsäurebakterien. *Bacterium mannitopœum* zählen wir zu der 2. der von Kruse (1; p. 287) aufgestellten Gruppen der Milchsäurebakterien, zu den sogenannten langen Milchsäurebazillen, die seltener in Milch als in den anderen der sauren Gärung verfallenen Stoffen pflanzlichen Ursprungs vorkommen, und zu denen Kruse auch die Bakterien der Brenneimaische und des Bieres zählt. In der Anordnung von L ö h n i s (1; p. 199) käme *Bacterium mannitopœum* in die Gruppe des *Bacterium caucasicum* (v. Freudenreich) L. et N., wo z. B. auch der *Bacillus Delbrücki* Leichm., *Bacillus acidificans longissimus* Lafar aufgeführt sind. Unter *Bacterium mannitopœum* verstehen wir sodann eine Anzahl von ähnlich sich verhaltenden Bakterien, die wir im Abschnitt über *Bacterium mannitopœum* als Rassen f, k, p, q und t ausführlich erwähnt haben. Es unterliegt keinem Zweifel, daß außerdem noch andere Rassen desselben existieren. Das von Müller-Thurgau (3) erwähnte Milchsäurestich verursachende *Bacterium* gehört ebenfalls zu *Bact. mannitopœum*. Infolge eines Druckfehlers ist die Dicke des Stäbchens 0,3 μ statt 0,8 μ angegeben. Unter der Bezeichnung *Bacillus pilluliformans* Müller-Thurgau ist (2; p. 93) ein Organismus beschrieben, der, soweit sich nach dem Aussehen der Einzelbakterien und der Bildung von Zoogloeen und dem Vorkommen im Wein schließen läßt, ebenfalls zu *Bacterium mannitopœum* gehört. Da das morphologische und physiologische Verhalten nicht ausreichend beschrieben ist, so läßt sich dieser Organismus leider nicht mehr identifizieren.

Nahe verwandt mit unserem *Bacterium mannitopœum* ist sodann das von Gayon und Dubourg in physiologischer Richtung genau untersuchte „ferment mannitique“ (1 u. 2). In den Umsetzungen zeigt dieses morphologisch weniger eingehend studierte *Bacterium* große Übereinstimmung. Doch weicht es in einigen Beziehungen stark ab vom *Bacterium mannitopœum*. So vergärt das „Mannitferment“ die l-Arabinose nicht, unser *Bacterium mannitopœum* dieselbe dagegen sehr energisch. Umgekehrt verhält es sich beim Milchzucker, der von „Mannitferment“ angegriffen wird, nicht aber vom *Bacterium mannitopœum*. Letzteres vermag aus Saccharose Mannit herzustellen, da es Endoinvertase bildet, ersteres ist hierzu nicht imstande. Amygdalin vermag *Bacterium mannitopœum* anzugreifen, das „Mannitferment“ nicht. Ebenso werden Äpfelsäure und Zitronensäure von *Bacterium mannitopœum*, nicht aber vom „Mannitferment“ abgebaut.

Laborde (3) züchtete aus umgeschlagenen Weinen 2 Stäbchenbakterien, die bei vergleichenden Versuchen sich ähnlich wie das Mannitbakterium von Gayon und Dubourg verhielten. Ebenso haben später Mazé

und Pacottet (1) aus umgeschlagenen, bitteren und linden Weinen Organismen gewonnen, die sich als Mannitbakterien erwiesen und die sie dem „Mannitferment“ von Gayon und Dubourg als nahe verwandt erachteten, worauf auch die dem Bilde zu entnehmende Beschaffenheit der Bakterien hinweist. Es würden also auch diese Organismen zu *Bacterium mannitopœum* gehören oder ihm doch nahe verwandt sein.

In bitteren Rotweinen findet man regelmäßig im Trub die schon von Pasteur (1) erwähnten und abgebildeten Bakterien, die in ihren Größenverhältnissen und Aussehen Ähnlichkeit mit dem *Bacterium mannitopœum* aufweisen, so daß man die Frage aufwerfen kann, ob diese Bitterbakterien, das sog. „Bitterferment“ Pasteurs, mit unserem *Bacterium mannitopœum* verwandt seien.

Wie schon erwähnt, haben Mazé und Pacottet aus bitteren Weinen Bakterien gezüchtet, die aus Lävulose Milchsäure und Mannit erzeugten, also zu den Mannitbakterien gehören. Allerdings sollen nach ihrer Angabe in bitteren Weinen Mannit und Milchsäure noch nie gefunden worden sein. Was nun diese letztere Angabe betrifft, so können wir erwähnen, daß es uns gelungen ist, in bei längerem Lagern auf der Flasche bitter gewordenen Rotweinen, die das typische „Bitterferment“ aufwiesen, Milchsäure in beträchtlichen Mengen nachzuweisen.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Milchsäure
Maienfelder Rotwein.	5,40°/00	0,97°/00	4,26°/00
Wallenstadter Rotwein	6,07°/00	1,84°/00	5,04°/00

Mannit konnte bei diesen beim Abfüllen auf Flaschen schon längst fertig vergorenen Weinen nicht mehr gebildet werden. Nun ist uns allerdings nicht bekannt, wieviel flüchtige Säure und Milchsäure die Weine vor dem Bitterwerden infolge Einwirkung anderer Bakterien enthielten; allein der hohe Gehalt zumal an Milchsäure weist doch darauf hin, daß die das Bitterwerden verursachenden Bakterien ganz wohl zu *Bacterium mannitopœum* gehören können. Demgemäß ist es trotz der von ihnen geäußerten Zweifel doch möglich, daß die von Mazé und Pacottet untersuchten Organismen identisch sind mit dem Pasteurschen „Bitterferment“, und daß dieses mit *Bacterium mannitopœum*, wenn nicht identisch, so doch verwandt ist.

Da Wortmann (4) das Pasteursche „Bitterferment“ als *Bacillus vini* bezeichnete, ohne den Organismus rein gezüchtet, morphologisch und physiologisch untersucht zu haben, so ist damit hinsichtlich dessen systematischer Stellung nicht viel gewonnen.

Nach den Dimensionen der Einzelstäbchen (1 μ Durchmesser) und dem Verhalten gegenüber Zitronensäure zu schließen, gehört wohl auch der von Seifert (3) in Johannisbeerweinen beobachtete aber nicht rein kultivierte und näher untersuchte und auch nicht benannte Organismus zu *Bacterium mannitopœum* oder in dessen Nähe.

Es schien uns von Interesse zu sein, noch einige der bekannteren Milch-

säurebakterien aus den übrigen Gärungsgewerben zum Vergleich heranzuziehen, soweit solche eine Ähnlichkeit mit unserem *Bacterium mannitopœum* aufweisen. Auf unseren Wunsch stellte uns Dr. W. Henneberg vom Institut für Gärungsgewerbe in Berlin den aus Brennereimaische stammenden *Bacillus Delbrücki*, Leichmann und den aus Berliner Weißbier gezüchteten *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* (Henneberg, 1) in freundlichster Weise zur Verfügung. Wir suchten die betreffenden Bakterien zunächst in einem Medium zu kultivieren, das sich sonst für das Wachstum solcher Bakterien sehr günstig erweist, nämlich in einem säurearmen Wasserbirnsaft von 2,34‰ Gesamtsäure (Äpfelsäure) und zwar direkt, und daneben auch noch im gleichen auf 0,50, 1,10 und 1,87‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure) entsäuerten Saft. In letzterem wuchs *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* sofort ausgiebig, später auch im nicht entsäuerten. *Bacillus Delbrücki* dagegen kam weder im einen noch im andern Saft zur Entwicklung. Er vermag also selbst diese geringen Säuremengen nicht zu ertragen, eine Eigenschaft, wodurch er sich stark von den Weinbakterien unterscheidet.

In einem besonderen Versuch wurden dann die durch den *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* verursachten Umsetzungen in einem entsäuerten und nicht entsäuerten Wasserbirnsaft festgestellt. Der Säuregehalt betrug direkt 2,35‰, nach der Entsäuerung 1,17‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure). Nach abgeschlossener mit Kohlensäureentwicklung verbundener Gärung, wobei sich ein starkes Depot von Bakterien gebildet hatte, war die Zusammensetzung dieser Obstsäfte folgende:

	Gesamtsäure (Äpfels.)	Flüchtige S. (Essigs.)	Nicht flücht. S. (Äpfels.)	Milchsäure
Entsäuerter Wasserbirnsaft	3,15‰	0,80‰	2,27‰	6,18‰
Nicht entsäuert. Wasserbirnsaft	3,02‰	0,43‰	2,55‰	5,26‰

Im Verhältnis zur entstandenen Milchsäure wurde durch den *Saccharobacillus* nur wenig flüchtige Säure gebildet. Er unterscheidet sich dadurch ganz wesentlich vom *Bacterium mannitopœum*, das unter ähnlichen Verhältnissen stets mehrere ‰ flüchtige Säure erzeugt. In dem entsäuerten Saft ist ein Teil der Milchsäure in gebundenem Zustande, denn die 6,18‰ Milchsäure ergeben, in Äpfelsäure umgerechnet, 4,59‰, während die gesamte nicht flüchtige Säure nur 2,27‰ beträgt; ca. 2,3‰ Milchsäure (als Äpfelsäure) sind also gebunden und wir können annehmen, daß sie durch Abbau von äpfelsauren Salzen entstanden sind. Der übrige Teil der Milchsäure wurde aus Zucker gebildet. In ähnlicher Weise läßt sich durch Berechnung dartun, daß auch in dem nicht entsäuerten Saft Milchsäure durch Abbau von Äpfelsäure und deren Salzen sowie geringer Mengen Zucker entstanden ist. Da bei diesem Versuche Mannit nicht bestimmt worden war und sich voraussichtlich auch nicht in größeren Mengen finden konnte, wurde ein ähnlicher Versuch mit einem schwach mit Äpfelsäure angesäuerten Hefeauszug, dem man ca. 8 Proz. Lävulose zusetzte, ausgeführt. Nach ca. 3 Wochen, bei einer Gärtemperatur von 23°, ergab sich folgendes Resultat:

	Gesamt- säure (Äpfels.)	Flüchtige Säure (Essigs.)	Nichtfl. Säure (Äpfels.)	Milch- säure	Zucker (Invert- zucker)
Vor der Gärung (steril)	0,74°/∞	0,36°/∞	0,34°/∞	0,61°/∞	ca. 80°/∞
Nach der Gärung	6,77°/∞	0,74°/∞	5,96°/∞	9,78°/∞	72,3°/∞

In dem eingedampften vergorenen Hefeauszug schieden sich keine Mannitkristalle aus. Es war übrigens schon aus der geringen Menge verschwundenen Zuckers zu schließen, daß *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* neben der großen Menge Milchsäure keinen Mannit bilden konnte. Er unterscheidet sich darin grundsätzlich von *Bacterium mannitopæum*, mit dem er in der äußeren Gestalt (Dicke der Fäden = 1 μ) und im Temperatur-Optimum Übereinstimmung zeigt. Auch von *Bacterium gracile* unterscheidet er sich hinsichtlich Mannitbildung: ferner erzeugt er in Abweichung von *Bact. gracile* und *Bact. mannitopæum* beim Abbau von Zucker neben viel Milchsäure wenig flüchtige Säure. Er würde darin eher mit *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* übereinstimmen, von denen er aber in der Form durchaus verschieden ist. Es ist wohl kaum anzunehmen, daß *Saccharobacillus pastorianus* var. *berolinensis* im Wein oder Obstwein eine Rolle spielt.

Um uns noch weiter zu vergewissern, daß unsere beiden aus Wein gezüchteten Bakterienarten (*Bacterium mannitopæum* und *Bacterium gracile*) ausschließliche Weinbakterien sind, zogen wir noch einige andere bekannte Milchsäurebakterien zu den Versuchen heran.

In verdankenswerter Weise wurden uns von Herrn Prof. Dr. Burri, Vorstand der bakteriologischen Versuchsanstalt Liebefeld bei Bern Reinkulturen von *Bacterium casei* ϵ (v. Freudenreich), isoliert aus Emmentaler Käse und *Bacterium Güntheri* (L. et N.) oder *Bacillus lactis acidii* Leichmann überlassen, sowie von Herrn Prof. Dr. Düggele an der Technischen Hochschule Zürich solche von *Bacterium acidilactici*, Hueppe, ferner *Bacterium lactis aërogenes* (Escherich) L. et H., also Milchsäurebakterien aus dem Molkereigewerbe.

Von diesen verschiedenen Organismen zeigten nur 3 ein ordentliches Gedeihen in einem, sowohl entsäuerten als nicht entsäuerten, Wasserbirnsaft mit 1,25°/∞ resp. 2,41°/∞ Gesamtsäure (als Äpfelsäure). Die durch sie hervorgerufenen Umsetzungen sind aus folgender Tabelle zu ersehen. Bei den betreffenden Versuchen befanden sich die Obstsäfte in mit Gärverschlüssen versehenen Flaschen während 2 Monaten bei 20°.

Um Wiederholungen zu vermeiden, haben wir in dieser Zusammenstellung auch noch 2 andere Vertreter der von uns studierten Bakterien, nämlich *Bacterium gracile* und *Micrococcus acidovorax* herbeigezogen.

Wie unser *Bacterium mannitopæum* verhielt sich keiner der übrigen Organismen, indem gerade diejenigen, die sich durch ausgiebiges Wachstum auszeichneten, nämlich *Bacterium aërogenes* und *Bact. acidilactici* nur geringe Mengen von Milchsäure erzeugten. *Bacterium Güntheri* dagegen, das ausgiebig Milchsäure bildete, produzierte daneben keine flüchtige Säure, verhielt sich also wie *Micro-*

coccus acidovorax. Außerdem unterscheiden sich *Bacterium mannitolpœum* und *Bacterium Güntheri* dadurch, daß ersteres den Milchzucker nicht vergärt. *Bacterium aërogenes* und *Bact. acidilactici* stimmten sowohl hinsichtlich des ausgiebigen Wachstums als auch in der geringen Fähigkeit, Milchsäure und flüchtige Säure zu erzeugen, miteinander überein, was darauf hindeutet, daß sie, wie von anderer Seite (Lehmann und Neumann; 1) schon behauptet wurde, identisch oder nahe verwandt sind. In ähnlicher Weise wie *Bacterium mannitolpœum* unterscheidet sich ferner *Bacterium gracile* von den 3 Milchbakterien, und auch die Übereinstimmung von *Micrococcus acidovorax* mit *Bacterium Güntheri* betrifft nur die speziell hervorgehobene Bildung von Milchsäure im Obstsaft, die ohne Erzeugung von flüchtiger Säure verläuft. Bei *Micrococcus acidovorax* haben wir es jedoch mit einem echten *Micrococcus* zu tun, was bei *Bacterium Güntheri* nicht der Fall ist.

Tabelle 68.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Zucker g im l	Extrakt g im l
Im entsäuerten Wasser- birnsaft						
<i>Bact. mannitolpœum</i>	9,25	5,07	3,68	5,62	60,06	149,5
<i>Bact. gracile</i>	1,67	1,45	0,07	4,14	92,32	158,1
<i>Micr. acidovorax</i>	2,41	0,13	2,27	4,94	99,32	159,1
<i>Bact. aërogenes</i>	2,47	0,27	2,17	1,00	90,64	147,9
<i>Bact. acidilactici</i>	2,01	0,13	1,87	0,90	94,57	154,1
<i>Bact. Güntheri</i> (<i>Bac. lactis acidilactici</i> Leichm.)	1,87	0,16	1,69	4,50	100,0	161,3
Im nicht entsäuerten Wasser- birnsaft						
<i>Bact. mannitolpœum</i>	9,11	4,76	3,88	5,26	63,92	150,4
<i>Bact. gracile</i>	2,27	1,62	0,49	4,14	94,52	156,9
<i>Micr. acidovorax</i>	3,08	0,19	2,87	4,72	99,40	156,9
<i>Bact. aërogenes</i>	2,54	0,30	2,21	0,66	94,7	143,6
<i>Bact. acidilactici</i>	2,34	0,23	2,09	0,66	100,39	154,2
<i>Bact. Güntheri</i> (<i>Bac. lactis acidilactici</i> Leichm.)	1,87	0,27	1,57	3,36	101,08	159,7

Ob *Bacterium aërogenes*, *Bact. acidilactici* und *Bacterium Güntheri* imstande wären, in schlecht vergorenen, noch zuckerhaltigen Weinen zu leben, scheint mit Rücksicht auf den Alkoholgehalt fraglich. Hier verdient noch angeführt zu werden, daß W. Seifert und R. Haid (1; p. 681) aus Milch verschiedene Milchsäurebakterien rein kultivierten und dieselben in Nährlösungen mit Weinsäure, Äpfelsäure und Milchsäure brachten. Einzelne vermochten die Äpfelsäure anzugreifen; die Weinsäure dagegen wurde nicht oder nur in geringem Grade zersetzt, Milchsäure gar nicht. Auch in Weinen beobachteten sie das Verhalten dieser Bakterien, wo letztere eine geringe Zunahme der Milchsäure und daneben eine Abnahme der Äpfelsäure bewirkten.

Bacterium gracile möchten wir ebenfalls wie *Bacterium mannitopæum* zu der 2. Gruppe der langen Milchsäurebakterien von Kruse rechnen, wenn es sich auch morphologisch der Gruppe des *Streptococcus lacticus* von Kruse nähert. Nach Löhnis würde es in die Gruppe des *Bacterium caucasicum* (v. Frdrch.) L. et N. einzureihen sein, aber vielleicht einen Übergang zur Gruppe des *Streptococcus pyogenes* bilden. Von den von anderer Seite beschriebenen Milchsäurebakterien ist keines, das wir hier noch zum Vergleich heranziehen müßten.

Die beiden *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* gehören unzweifelhaft zur 4. Gruppe Kruses, zu der Gruppe der Säurelabbildner Gorinis, in der allerdings Bakterien von sehr verschiedenartigen Eigenschaften zusammengefaßt werden. Nach Löhnis reihen sie sich in ungezwungener Weise in die 4. Gruppe des *Micrococcus pyogenes* Rosenbach (*Micrococcus lactis acidii*) ein.

Die beiden Organismen *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* können nicht etwa zu einer einzigen Art zusammengefaßt werden, denn sie zeigen in morphologischer und physiologischer Richtung zu große Verschiedenheiten. Die Einzelkokken bei *Micrococcus acidovorax* messen nur 0,5 μ , während diejenigen von *Micrococcus variococcus* stets größer sind und einen Durchmesser von 0,7—1,5 μ aufweisen. Dabei möge ausdrücklich bemerkt werden, daß diese Größenunterschiede nicht etwa das Resultat verschiedener Kultur sind, sondern sich bei der Entwicklung in den gleichen Medien, welcher Art diese waren, immer wieder einstellen und zwar während der Jahre lang andauernde Versuchen. Dasselbe gilt übrigens auch für *Bacterium mannitopæum* und *Bacterium gracile*, welche Bakterien ihre charakteristischen Eigenschaften ebenfalls während der Jahre lang sich immer wiederholenden Kultur in verschiedenen Medien treu beibehielten.

Auch in physiologischer Hinsicht zeigen die beiden Mikrokokken grundsätzliche Verschiedenheiten, indem *Micrococcus acidovorax* Laktose ziemlich energisch und Maltose sehr gut umsetzt, während *Micrococcus variococcus* erstere Zuckerart gar nicht und letztere nur wenig angreift. Andererseits hat *Micrococcus variococcus* die Fähigkeit, Amygdalin lebhaft umzusetzen, während dem *Micrococcus acidovorax* diese Eigenschaft vollständig abgeht. Bei den meisten hier nicht genannten Verbindungen erwies sich *Micrococcus acidovorax* kräftiger im Abbau als *Micrococcus variococcus*.

In diese Gruppe der *Micrococcus*-arten gehört auch *Micrococcus malolacticus*, Seifert. Nach Größe der Kokken (Durchmesser 1 μ) stimmt er mit *Micrococcus variococcus* überein, ebenso im Verhalten gegenüber Äpfelsäure und äpfelsaurem Kalium, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure. Dagegen zeigt er bedeutungsvolle Unterschiede im Verhalten gegenüber Hexosen, indem er die Lävulose gar nicht angreift und Dextrose zersetzt ohne Bildung von Milchsäure. Gestützt auf diese wichtigen Unterschiede halten wir uns nicht für berechtigt, unseren *Micrococcus variococcus* mit dem *Micrococcus malolacticus* zu vereinigen. Es wären demnach 3 verschiedene für den Ausbau der Weine wichtige Mikrokokken bekannt, *Micrococcus malo-*

lacticus Seifert, *Micrococcus acidovorax* nov. spec. und *Micrococcus variococcus* nov. spec.

Außer diesen rein gezüchteten, in morphologischer und physiologischer Hinsicht genauer studierten Mikrokokken finden sich in der Literatur noch von Kramer und Wortmann benannte Mikrokokken angeführt. Der von Wortmann in bitteren Weinen beobachtete *Micrococcus vini* wurde jedoch nicht rein kultiviert und auch nicht genauer untersucht. Die Angabe, daß dieser *Micrococcus vini* in Weinen vornehmlich flüchtige Säure bilde, zeigt deutlich, daß derselbe jedenfalls nicht zu einer der Arten gehört, die im vorstehenden erwähnt sind. Die von Kramer gezüchteten *Micrococcus saprogenes vini* I und II, sowie übrigens auch die von ihm isolierten *Bacillus saprogenes vini* I—VII möchten wir nicht zu den eigentlichen Weinbakterien zählen, da sie aus stark zersetzten Weinen mit fauliger Gärung gewonnen wurden und mit den späterhin von den verschiedenen Autoren aus Wein gezüchteten Bakterien keinerlei Übereinstimmung zeigen.

Kapitel IV.

Die durch Bakterien verursachten Veränderungen im Wein, beurteilt auf Grund der mit Reinkulturen gewonnenen Ergebnisse.

Beim Auftreten von Bakterien in Weinen und Obstweinen zeigen sich Verschiedenheiten mannigfaltiger Art, so namentlich auch hinsichtlich der Erzeugung von Trübungen. Bei nur langsamer Entwicklung, bei der aber bei längerer Dauer doch tiefgreifende Umsetzungen im Wein zustande kommen können, findet oft keine oder doch nur eine kaum bemerkbare Trübung statt, so daß der erwähnte Vorgang dem die Weine behandelnden Techniker leicht entgeht; nur die geschmacklichen Veränderungen des Weines und eine eventuell vorgenommene chemische Untersuchung lassen dann die Anwesenheit und Wirksamkeit der Bakterien erkennen. In vielen anderen Fällen dagegen geschieht die Bakterienvermehrung so rasch und sind die Umsetzungen so energisch, daß starke Trübungen des Weines, Kohlensäureentwicklung usw. auch den weniger erfahrenen Praktiker darauf hinweisen, daß jetzt im Wein wichtige Veränderungen vor sich gehen. Welcher Art diese sind, läßt sich zunächst allerdings aus diesen direkt der Beachtung sich aufdrängenden Erscheinungen nicht mit Sicherheit schließen. Ja sogar die chemische Untersuchung des veränderten Weines kann nicht immer den gewünschten Aufschluß geben. Es ist dazu in manchen Fällen unbedingt noch die Feststellung und genaue Kenntnis der Bakterien, welche die Umsetzungen vollzogen, erforderlich. Da bei den zur Lebensmittelkontrolle gelangenden Weinen diese Organismen häufig nicht mehr vorhanden sind, weil sie sich entweder am Boden der Fässer abgesetzt haben oder aber durch die Kellerbehandlung des Weines, Abzug, Schönung, Filtration usw. entfernt wurden, so ist es oft nicht möglich, den Zusammenhang der festgestellten abnormalen Zusammensetzung des Weines mit der Tätigkeit von Bakterien richtig zu erkennen und ein sicheres Urteil über das Zustandekommen der fehlerhaften Beschaffenheit zu erlangen. Die in diesem Kapitel mitgeteilten Versuche und Erfahrungen verfolgen nun den Zweck, die in unserer Arbeit bisher angeführten Ergebnisse weinbakteriologischer Forschung auf das

praktische Gebiet zu übertragen und so deren Nutzbarmachung, sowohl bei der Behandlung der Weine als auch bei ihrer Kontrolle, zu erleichtern. Es soll dabei in erster Linie die Rede sein vom Säureabbau, sodann vom Milchsäurestich und der Mannitgärung, dem Mäuselgeschmack, dann vom Umschlagen der Weine und endlich in einem besonderen Kapitel von der Beeinflussung der Weinkontrolle durch die gefundenen Ergebnisse.

1. Der Säureabbau.

Dieser für die Ausbildung der Weine so außerordentlich wichtige Vorgang ist in den letzten 10 Jahren von verschiedener Seite eingehend studiert worden, wie wir in Kapitel I, p. 150, näher dargelegt haben. Solange eine genaue Methode zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure fehlte, war es nicht möglich, einen richtigen Einblick in den Säureabbau zu erlangen und erst die diesbezüglichen Veröffentlichungen von Möslinger und Kunz gestatteten ein tieferes Eindringen in diese Vorgänge. Die durch Jahrzehnte aufgespeicherten Ergebnisse von Weinanalysen, in denen die Milchsäurebestimmungen fehlen, lassen, soweit es sich wenigstens um die Säure handelt, wenig Schlußfolgerungen zu. Wären in diesen Zusammenstellungen Angaben über die Milchsäuremengen vorhanden, so würden wir nicht nur näheren Aufschluß über die Qualität der Säuren, sondern auch einen Einblick in die Entwicklung der Weine erhalten.

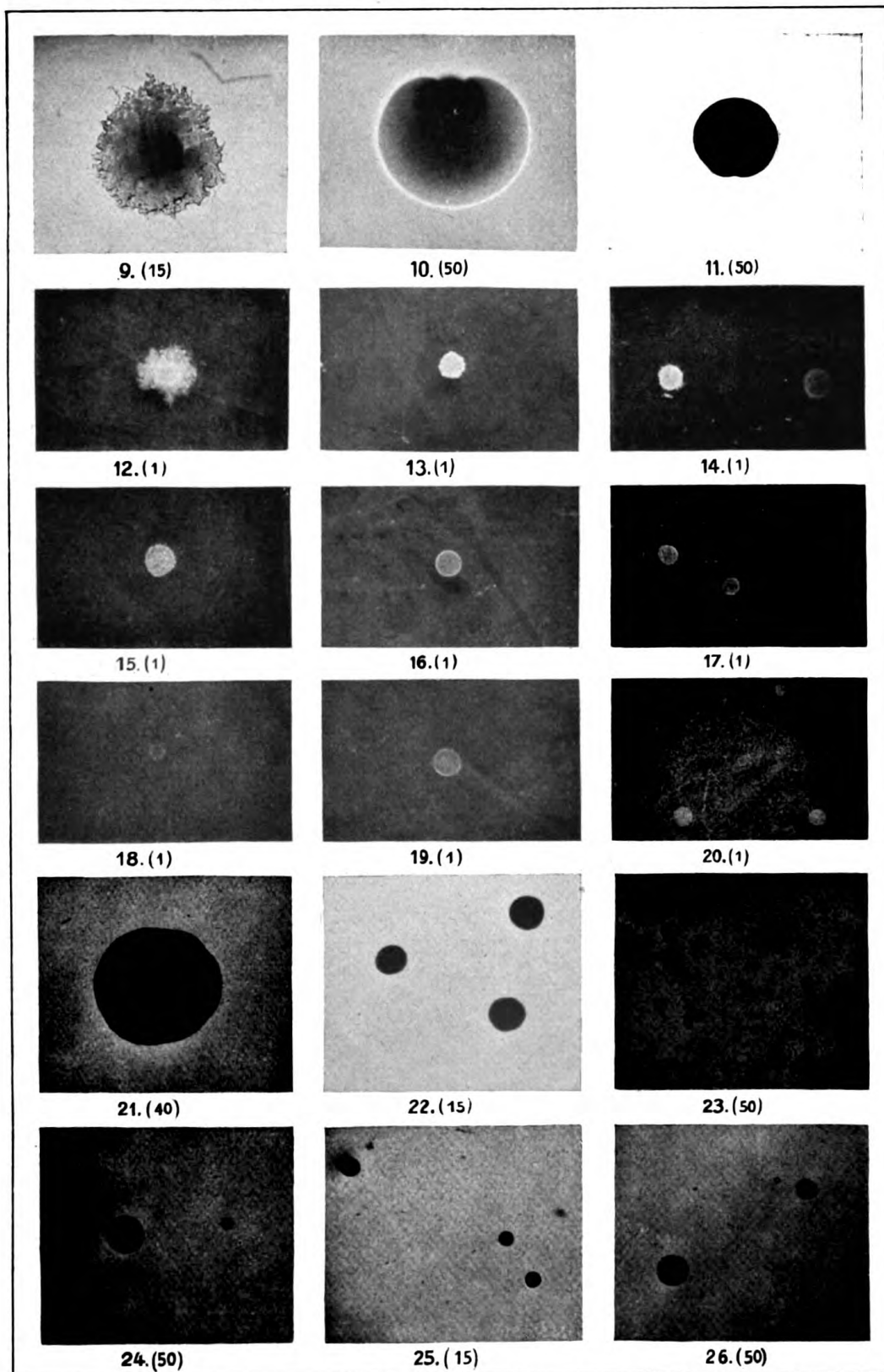
Im nachfolgenden soll nun an einer Reihe von Beispielen dargetan werden, in welcher verschiedener Weise der Säureabbau in Weinen auftritt und wie derselbe durch chemische und mikroskopische Untersuchung nachgewiesen werden kann.

Wenn dabei wiederum eine Anzahl Obstweine herangezogen werden, so geschieht dies deshalb, weil hier der Säureabbau, besonders bei den Apfelweinen, ziemlich regelmäßig eintritt und weil andererseits die hier beobachteten Vorgänge nach unserer Erfahrung die gleichen sind wie bei den Traubenweinen.

Als ein erstes Beispiel sei ein 1911er Elblingwein angeführt. Den betreffenden Traubensaft überließ man der spontanen Gärung. Nach ca. 4 Monaten wurde der Wein untersucht und zeigte jetzt schon, wie sich aus nachfolgender Zusammenstellung ergibt, einen deutlichen Säureabbau.

	Gesamtsäure (Äpfels.) g im l	Flüchtige Säure (Essigs.) g im l	Nicht flüchtige Säure (Äpfels.) g im l	Milchsäure g im l	Alkohol g im l	Zucker g im l	Extrakt g im l
Traubensaft vor der Gärung . . .	12,06	0,17	11,87	0,72	—	66°	—
Wein.	7,91	0,48	7,38	3,92	66,8	Öchsle Spuren	21,4

Hieraus läßt sich folgendes schließen: Es hat ein Säureabbau stattgefunden, wie die Abnahme der nicht flüchtigen Säure um $4,49^{\circ}/_{\infty}$ deutlich zeigt. Aus der gebildeten Milchsäuremenge und aus der geringen Zunahme der flüchtigen Säure läßt sich auf eine ziemlich reine Milchsäurebildung aus Äpfelsäure schließen. Als Bakterien, die hierzu befähigt sind, kämen alle 4



Verlag von Gustav Fischer in Jena.

von uns beschriebenen in Betracht. *Bacterium mannitopœum* vermag allerdings die Äpfelsäure weniger gut abzubauen; allein es ist namentlich der ursprünglich hohe Säuregehalt, der darauf hinweist, daß diese Art hier nicht wirksam sein konnte. Der gleiche Grund spricht auch gegen eine Mitwirkung von *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus*, so daß von den von uns studierten Bakterien nur *Bacterium gracile* in Betracht kommen könnte. In Übereinstimmung damit steht nun die mikroskopische Untersuchung des Trubes, der neben *Saccharomyces ellipsoideus* Zellen und Sporen von *Botrytis cinerea* viele gleichmäßig beschaffene zarte Bakterien (Stäbchen und Fäden) vom Typus des *Bacterium gracile* enthielt. Wir möchten hier gleich bei diesem ersten Beispiel davor warnen, nach dem bloßen Aussehen, ihren Dimensionen, im Wein auftretende Bakterien mit einer bestimmten Art zu identifizieren. In dem vorliegenden Fall sind wir aber doch berechtigt, mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit das *Bacterium* als *Bacterium gracile* zu betrachten, weil auch die Veränderungen, die der Wein erlitten hat, hiermit übereinstimmen, nämlich der Säureabbau, der allerdings noch nicht beendet ist, die Bildung von viel Milchsäure neben wenig Essigsäure, wozu dann noch die Widerstandsfähigkeit gegen hohen Säuregehalt kommt.

Ziemlich zu gleicher Zeit wie der vorige Wein gelangten im Herbst 1911 noch 2 andere Weißweine, nämlich einer von Räuschling und ein solcher von Riesling-Sylvaner zur spontanen Vergärung. Ebenfalls nach ca. 4 Monaten wurden die Weine untersucht und ergaben folgende Zusammensetzung:

	Gesamtsäure (Äpfels.) g im l	Flüchtige Säure (Essigs.) g im l	Nicht flüch- tige Säure (Äpfels.) g im l	Milchsäure g im l	Alkohol g im l	Gesamt- Zucker g im l	Extrakt g im l
Räuschlingsaft vor der Gärung . .	7,23	0,28	6,92	0,60	—	72,5° Öchsle	—
Wein.	4,02	0,72	3,23	2,30	81,96	0,56	19,4
Riesling-Sylvanersaft vor der Gärung	7,24	0,47	6,72	0,60	—	—	—
Wein.	3,75	0,60	3,09	2,80	82,24	0,46	19,1

Die beiden Weine zeigten in ihrem Verhalten große Übereinstimmung, indem die Säure stark abgebaut war. In beiden Fällen sank der Gehalt an nicht flüchtiger Säure bis unter die Hälfte des ursprünglichen. Mit einer ziemlichen Milchsäurebildung ging nur eine ganz geringe Erzeugung von flüchtiger Säure Hand in Hand. Es ist also hier der Säureabbau durch eine reine Milchsäuregärung zustande gekommen. Im Trub fanden sich wie in dem vorhergehenden genauer beschriebenen Beispiel neben der Hefe in großer Zahl die zarten Stäbchen und Fäden eines Bacteriums, das wir wohl auch hier als *Bacterium gracile* betrachten dürfen.

Auffällig erscheint, daß ein vierter gleichzeitig hergestellter und gleichgelagerter Wein aus frührotem Veltliner keinen ausgesprochenen Säureabbau zeigte. Wohl nahm die Gesamtsäure um etwa 1⁰/₁₀₀ ab, allein da so gut wie keine Milchsäure gebildet wurde, handelt es sich hier offen-

bar um einen anderen Vorgang, der wohl dem Ausscheiden von Weinstein und vielleicht auch einem geringen Säureverbrauch durch die Hefe zugeschrieben werden muß, da nach der Untersuchung des Trubes sich neben der Hefe keine Bakterien vorfanden. Nun vermögen wir allerdings keine Erklärung zu geben, warum in diesem Wein, der mit den gleichen Keltereinrichtungen hergestellt wurde, wie die vorgenannten 3 und sicher auch anfangs vereinzelte säureverzehrende Bakterien enthielt, diese sich nicht zu vermehren vermochten. Der Säuregehalt kann nicht wohl die Ursache sein, da er ja nicht höher als bei den vorigen war; dasselbe gilt von der flüchtigen Säure, sowie vom Zucker- bzw. Alkoholgehalt. Ob vielleicht die Säure eine andere war als bei den übrigen (vorwiegend Weinsäure?) oder ob der Saft dieser Traubensorte eine Substanz enthielt, die die Entwicklung der Bakterien verhinderte oder ob endlich ein anderer Umstand hier mitwirkte, vermögen wir nicht zu entscheiden.

Belehrend ist auch das Verhalten eines spontan vergorenen 1911er Gutedelweines unserer Anstalt, der nach der Gärung $6,36^{\circ}/_{\infty}$ Gesamtsäure (als Äpfelsäure berechnet), $0,45^{\circ}/_{\infty}$ flüchtige Säure (als Essigsäure), $5,86^{\circ}/_{\infty}$ nicht flüchtige Säure (als Äpfelsäure), $2,24^{\circ}/_{\infty}$ Milchsäure und $71,4$ Gewichts- $^{\circ}/_{\infty}$ Alkohol enthielt. Der ziemlich hohe Gehalt an Milchsäure und die geringe Bildung flüchtiger Säure weisen wieder auf einen reinen Säureabbau hin. Bei Beginn der Gärung enthielt der betreffende Traubensaft $7,5^{\circ}/_{\infty}$ Gesamtsäure (als Äpfelsäure) und $0,29^{\circ}/_{\infty}$ flüchtige Säure (als Essigsäure). Vergleicht man mit der verhältnismäßig geringen Abnahme an nicht flüchtiger Säure die Menge der gebildeten Milchsäure, so könnte man leicht zu dem Schlusse gelangen, es sei hier nicht nur Milchsäure durch Abbau aus Äpfelsäure entstanden, sondern auch solche aus Zucker gebildet worden. Allerdings müßte dies bei dem geringen Gehalt an Essigsäure durch eine Bakterie geschehen sein, die bei dieser Milchsäuregärung des Zuckers keine flüchtige Säure bildet, wie dies z. B. bei unseren beiden Mikrokokken der Fall ist. Im Trub dieses Weines fanden sich aber nur die feinen Stäbchen und Fäden des *Bacterium gracile*, nicht aber die Mikrokokken, so daß eben doch nur ein Abbau von Äpfelsäure stattfand. Dieser war aber beträchtlicher als die Bestimmung der nicht flüchtigen Säure vor und nach der Gärung erkennen läßt. Vor dem Säureabbau wird hier eben während der Gärung durch Hefen noch eine Säurebildung stattgefunden haben, durch die der Verlust der abgebauten Äpfelsäure dann teilweise gedeckt wurde. Zu einer solchen Annahme ist man einigermaßen berechtigt, weil in zahlreichen anderen Fällen zwischen der neu gebildeten Milchsäure und der abgebauten Äpfelsäure ein bestimmtes Verhältnis regelmäßig zutage tritt.

Der Säureabbau in unseren Weinen und Obstweinen findet nach unseren Beobachtungen häufig durch *Bacterium gracile* statt. Doch können, nach Kulturversuchen mit rein gezüchteten Organismen zu schließen, auch unsere beiden *Micrococcus*-Arten, sowie der *Micrococcus malolacticus* Seifert in gleicher Weise wirken, erstere beide allerdings nur dann, wenn die Weine nicht einen zu hohen Säuregehalt besitzen. Wir haben auch zu wiederholten Malen in Weinen, die einen spontanen Säureabbau erkennen ließen, als fast einzig vorkommende Bakterien Mikrokokken gefunden. Ein Waadtländer Wein 1911 (von Cully?), der gerade im Säureabbau begriffen war, enthielt $4,75^{\circ}/_{\infty}$ Gesamtsäure (als Äpfelsäure), $0,78^{\circ}/_{\infty}$ flüchtige Säure (als Essigsäure) und $2,24^{\circ}/_{\infty}$ Milchsäure. Der Trub

dieses Weines bestand fast aus einer Reinkultur von Mikrokokken in Form von Einzelkokken im Durchmesser von 0,5 μ , Diplokokken und Merismopedien. Das ausschließliche Vorkommen dieser Organismen und die erhebliche Menge von Milchsäure neben wenig flüchtiger Säure zeigten, daß wir es hier mit einem Säureabbau durch einen *Micrococcus* zu tun haben, der nach seinen Größenverhältnissen wohl mit dem von uns genauer beschriebenen *Micrococcus acidovorax* identisch ist.

Wie rasch bei unseren Weinen dieser Säureabbau oft eintritt, zeigt folgendes Vorkommnis. Wir ließen zu anderweitigen Versuchszwecken aus verschiedenen besseren schweizerischen Weinbaugegenden 1911er Rot- und Weißweine kommen und zwar schon bald nach abgeschlossener Gärung. Die Weine trafen von Mitte Dezember bis Mitte Januar bei uns ein und zwar wurden sie von Produzenten geliefert, auf deren Zuverlässigkeit wir uns verlassen durften. Fast alle diese Weine fanden sich in einem Zustand der Säuregärung. Sie erschienen getrübt und zwar, wie die mikroskopische Untersuchung ergab, durch Bakterien, und entwickelten zum Teil lebhaft Kohlensäure. Die sofort vorgenommene chemische Untersuchung ergab folgendes:

Tabelle 69.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Zucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Rotweine:							
1. Rheinau (Zürich)	4,14	0,70	3,37	2,46	0,84	77,72	23,8
2. Flaach (Zürich)	5,34	0,98	4,27	2,92	0,74	67,16	22,6
3. Hallau (Schaffhausen)	5,87	0,41	5,42	1,46	0,91	75,02	23,3
4. Weinfelden (Thurgau)	6,54	0,40	6,10	0,94	0,90	77,09	24,9
5. Buchberg (Rheintal)	3,34	0,62	2,66	2,70	0,45	82,03	22,7
6. Malans (Graubünden)	4,07	0,66	3,34	2,80	0,78	89,70	25,1
7. Dôle (Wallis)	4,60	0,85	3,66	2,12	1,19	89,59	25,9
8. Marcemino (Veltlin)	4,80	0,94	3,77	3,24	0,71	84,20	20,0
9. La Gatta (Veltlin)	6,07	0,55	5,46	0,94	0,99	87,0	24,2
Weissweine:							
10. Herrliberg (Zürichsee)	5,43	0,54	4,84	0,76	0,82	81,96	20,5
11. Meilen (Zürichsee)	3,58	0,79	2,71	2,34	0,53	82,24	17,9
12. Hombrechtikon (Zürich)	4,04	0,83	3,13	2,56	0,24	72,11	19,1
13. Auf Dorf-Feldbach (Zürich)	5,40	0,53	4,82	1,26	0,67	66,04	18,4
14. Schinznach (Aargau)	4,46	0,53	3,88	2,80	0,43	72,53	18,9
15. Twann (am Bielersee)	3,67	0,74	2,86	2,02	0,44	77,37	15,80

Wie der ziemlich hohe Milchsäuregehalt bei der größeren Zahl erkennen läßt, war in diesen Weinen der Säureabbau zur Zeit der Untersuchung, also nur etwa 2 Monate nach der Weinlese, schon weit vorgeschritten, wenn auch, wie die Kohlensäureentwicklung erkennen ließ, noch nicht ganz abgeschlossen. Auch das Verhältnis der nicht flüchtigen Säure zur Milchsäure weist darauf hin, daß noch unzersetzte Fruchtsäure vorhanden gewesen sein muß, ob aber Äpfelsäure oder Weinsäure, ist natürlich fraglich. Die mikroskopische Untersuchung der Weine ergab stets das Vorhandensein zahlreicher Bakterien vom Habitus des *Bacterium gracile*.

Man könnte finden, es stehe die festgestellte Menge der flüchtigen Säure nicht mit unseren bisherigen Ausführungen im Einklang. Allein es ist zu berücksichtigen, daß es sich hier nicht um Reinkulturen, sondern um spontan vergorene Weine aus praktischen Betrieben handelt, die, namentlich bei in üblicher Weise an den Treestern vergorenen Rotweinen, in der Regel etwas mehr flüchtige Säure aufweisen, als mit Reinhefe vergorene Traubensäfte. Und bei einigen der Weißweine ist darauf hinzuweisen, daß da und dort faule Trauben mit zur Verwendung kamen. Wir sind daher der Überzeugung, daß in den vorliegenden Fällen die Milchsäure von einem Säureabbau durch Bakterien vom Typus des *Bacterium gracile* herrührt.

Überblickt man die in der Tabelle 69 angeführten Milchsäuregehalte, so treten als milchsäureärmere Weine, in denen also der Säureabbau noch nicht so weit vorgeschritten war, Weinfeldern mit 0,94, La Gatta mit 0,94, Herrliberg mit 0,76 und Feldbach mit 1,26‰ Milchsäure besonders hervor. Versuche, in diesen Weinen nach der Sterilisation derselben durch unsere Bakterien einen weiteren Säureabbau herbeizuführen, waren von Erfolg, während in den übrigen Weinen, mit denen der Versuch ebenfalls ausgeführt wurde, ein nennenswerter Säureabbau nicht mehr eintrat.

Von den verwendeten Bakterien (*Bacterium manniopœum* (f), *Bacterium gracile* (a, w, i), *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* (h und n)) vermochten nur die 3 Rassen von *Bacterium gracile* einen weiteren Säureabbau zu verursachen, und zwar betrug bei Weinfeldern der endgültige Milchsäuregehalt: 2,7—2,9‰, bei La Gatta 2,5—2,8‰, bei Feldbach 2,46‰ und bei Herrliberg 2,24‰. Während die Menge der flüchtigen Säure bei diesem nachträglichen Säureabbau gleich blieb oder nur unbedeutend zunahm, ist naturgemäß der Gehalt an Gesamtsäure entsprechend gesunken, bei Weinfeldern von 6,54 auf 4,54, bei La Gatta von 6,07 auf 4,64, bei Herrliberg von 5,43 auf 3,27 und bei Auf Dorf-Feldbach von 5,40 auf 4,23‰ (die Säure als Äpfelsäure berechnet).

Da bei den übrigen Weinen die Säure nicht weiter abgebaut wurde trotz des Zusatzes der gleichen Bakterien, so muß man wohl schließen, daß die noch vorhandene nicht flüchtige Säure neben Milchsäure noch aus nicht abbaubaren Säuren, Weinsäure, Bernsteinsäure usw. besteht.

Weiteren Aufschluß über das Wesen des Säureabbaues mögen noch folgende einer größeren Versuchsreihe (Müller-Thurgau und Osterwalder 4, p. 369) entnommenen Angaben liefern. Bei einem Versuch mit Birnsaft (von Fischbächler Birnen) ließ man einen Teil spontan vergären, während der übrige sterilisiert und dann mit Reinhefe zur Vergärung gebracht wurde. Nach der Gärung untersuchte man die Birnweine. Bei einem Teil der Versuchsgefäße verblieb der Wein weiterhin auf dem Trub und wurde später noch zweimal untersucht. Daneben fanden sich auch Versuchsgefäße mit vom Hefetrub abgezogenem Birnwein. Bei den spontan vergorenen ergab sich folgendes Resultat: (S. Tab. 70.)

Obgleich die Weine während der Gärung, also bis zum 21. Dezember, und sodann auch noch während der weiteren Lagerung bis zum 12. Mai in einem Raume von 15° weilten, fand doch bis zum letzteren Zeitpunkt kein Säureabbau statt. Während des Sommers stieg die Temperatur des betreffenden Raumes, und wahrscheinlich aus diesem Grunde trat dann bis zum 29. Oktober ein Säureabbau ein. Dieser erwies sich als eine reine Milchsäure-

gärung, wobei sehr viel Milchsäure und nur wenig flüchtige Säure gebildet wurde. Im Hefetrub befanden sich neben elliptischer Hefe und ca. 50 Proz. Zellen von *Saccharomyces apiculatus* zahlreiche Bakterien vom Typus des *Bacterium gracile* sowie zahlreiche kleine zu Gruppen vereinigte Zoogloeen.

Tabelle 70.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Fischbächlersaft, unvergoren . . .	8,04	0,09	7,94	1,00	84,30	—	134,3
„ spontan vergoren (21. Dez. 1909)	8,31	0,28	8,00	0,66	2,97	40,44	41,1
„ spontan vergoren, mit Trub (12. Mai 1910) . .	8,44	0,46	7,93	1,01	—	—	—
„ spontan vergoren, mit Trub (29. Okt. 1910) . .	4,22	0,62	3,54	5,26	—	—	—
„ spontan vergoren, ohne Trub (29. Okt. 1910) . .	8,24	0,36	7,84	0,90	—	—	—

Anders verhielten sich nun die nach der Gärung vom Hefetrub abgezogenen und dann weiterhin gelagerten Birnweine. Diese zeigten selbst am letzten Termin (siehe letzte Zeile der Tabelle) noch keinen Säureabbau; wie auch die mikroskopische Untersuchung ergab, haben sich die Bakterien hier nicht entwickelt. Der verhältnismäßig hohe Gerbstoffgehalt dieses Obstsaftes ($2,94^{\circ}/_{\infty}$) mag hier wohl hemmend auf die Entwicklung der säureabbauenden Bakterien eingewirkt haben, während bei Anwesenheit des Trubes dieser hemmende Einfluß zum Teil aufgehoben oder durch einen günstigeren Ernährungseinfluß ausgeglichen wurde. Auf alle Fälle ist hier an einem Beispiel der fördernde Einfluß des Trubes auf den Säureabbau festgestellt worden.

Auf Grund zahlreicher Beobachtungen können wir uns von vorneherein dahin aussprechen, daß in diesem Versuche nicht etwa die Hefen, sondern die Bakterien den Säureabbau herbeigeführt haben. Um jedoch jeden Zweifel auszuschließen, seien hier noch die Ergebnisse der chemischen Untersuchung des nämlichen, jedoch sterilisierten und hernach mit der Obstweinhefe Tägerwilen vergorenen Birnsaftes angeführt.

Wie die in der Tabelle 71 enthaltenen Angaben deutlich erkennen lassen, hat durch die Hefe ein Säureabbau nicht stattgefunden. Der Gehalt an nicht flüchtiger Säure nahm im Gegenteil noch etwas zu.

Daß ein Gerbstoffgehalt, wie er sich in diesem Fischbächlerwein vorfand, hemmend auf den Säureabbau einwirken kann, vermögen wir noch durch ein anderes Versuchsergebnis zu belegen. Ein Marxenbirnwein, der unvergoren $125,4^{\circ}/_{\infty}$ Zucker (Invertzucker), $5,16^{\circ}/_{\infty}$ Gesamtsäure (als Äpfelsäure), $0,06^{\circ}/_{\infty}$ flüchtige Säure und $1,88^{\circ}/_{\infty}$ Gerbstoff enthielt, wurde zum Teil direkt, zum Teil nach Verminderung des Gerbstoffgehaltes durch Hautpulver, der spontanen Gärung überlassen. Einige Zeit

Tabelle 71.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flücht. Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Fischbächlensaft, unvergoren . . .	8,04	0,09	7,94	1,00	84,30	—	134,3
„ m. Reinhefe verg. (21. Dez. 1909)	8,71	0,12	8,58	0,66	0,75	41,52	38,56
„ m. Reinhefe verg. m. Trub (12. Mai 1910)	8,91	0,26	8,62	0,66	—	—	—
„ m. Reinhefe verg. mit Trub (29. Okt. 1910)	8,71	0,14	8,56	0,90	—	—	—
„ m. Reinhefe verg. ohne Trub (29. Okt. 1910)	8,84	0,15	8,67	—	—	—	—

nach Abschluß derselben zeigte sich, daß in dem Weine, dessen Gerbstoffgehalt auf die Hälfte herabgesetzt worden war, ein Säureabbau stattgefunden hatte, nicht aber in demjenigen, dessen Gerbstoffgehalt man unverändert ließ.

	Gesamtsäure (Äpfels.) g im l	Flüchtige (Essigs.) g im l	Nicht flücht. Säure (Äpfels.) g im l	Milchsäure g im l
Birnwein mit 1,88‰ Gerbstoff	5,12	0,13	4,97	1,12
Birnwein mit 0,94‰ Gerbstoff	4,04	0,70	3,24	3,37

Nicht immer wird der fördernde Einfluß des Hefetrubes erforderlich sein, um das spontane Auftreten des Säureabbaues im Wein zu ermöglichen. Dieser wird auch ohne Hefetrub dann sich einstellen können, wenn die sonstigen Verhältnisse für das Gedeihen der Bakterien günstig sind, wenn es z. B. an dem hemmenden Einfluß des Gerbstoffes fehlt, wie das ja bei Äpfelsäften in der Regel der Fall ist. Nachfolgendes, aus unseren Versuchen (Müller-Thurgau und Osterwalder 3; p. 354) herausgegriffenes Beispiel mag dies zeigen.

Ein Äpfelsaft (aus Rothenhauser Holzäpfeln) wurde am 27. Oktober in Flaschen der spontanen Gärung überlassen und nach Abschluß derselben am 7. Dezember untersucht. In einem Teil der Versuchsflaschen blieb dann der Apfelwein auf der Hefe liegen, in anderen wurde er von der Hefe abgezogen und am 11. Mai wieder untersucht. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 72 zu ersehen.

Während der Gärung fand kein Säureabbau statt, wohl aber trat hernach ein solcher ein und war am 11. Mai vollständig beendet und zwar sowohl in dem auf dem Trub liegenden als auch in dem vom Trub abgezogenen Wein. Im Trub fanden sich neben den Hefezellen (*Saccharomyces ellipsoideus* und *Saccharomyces apiculatus*) zahlreiche Bakterien in Form von zarten zum Teil miteinander verflocht-

tenen Fäden des Typus *Bacterium gracile*. Aus der Tabelle ist zu ersehen, wie rein (d. h. ohne Nebenprodukte) diese Bakterien die Äpfelsäure zu Milchsäure abbauen, was aus dem geringen Gehalt an flüchtiger Säure hervorgeht. Unser *Bacterium gracile* haben wir aus diesem Obstwein gewonnen.

Tabelle 72.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Äpfelsaft, unvergoren	8,41	0,06	8,34	0,66	102,56	—	134,4
Äpfelwein, vergoren (7. Dez. 1909)	8,30	0,25	8,02	1,06	0,90	44,46	28,0
„ vergoren, m. Trub (11. Mai 1910)	3,98	0,37	3,57	4,50	—	—	—
„ vergoren, ohne Trub (11. Mai 1910)	4,02	0,39	3,59	5,26	—	—	—

Wie sehr die Entwicklung der Säure abbauenden Bakterien von der Temperatur des Weines abhängt, möge folgender Versuch dartun.

Ein Äpfelsaft (von „Dohuber Wildling“) wurde am 26. Oktober in Fässer von 6 Hektoliter, sowie in eine kleine Anzahl Flaschen à 500 ccm abgefüllt. Letztere, mit Gärverschlüssen versehen, standen in einem Raum von 16°, während die Kellertemperatur ca. 9° betrug. In den Flaschen war der Wein schon nach 3 Wochen vergoren, so daß er am 14. November untersucht werden konnte; nach weiteren 3 Wochen, am 8. Dezember, war auch der Säureabbau vollendet. Im Keller verlief die Gärung langsamer und war erst am 20. Dezember abgeschlossen. Der Säureabbau trat aber, wie aus Tabelle 73 zu ersehen ist, viel später ein.

Tabelle 73.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Äpfelsaft, unvergoren	8,98	0,12	8,85	0,86	84,39	—	121,3
Äpfelwein, in Flaschen vergoren (am 14. Nov. 1910) . . .	7,70	0,42	7,24	1,01	1,18	41,3	26,7
Äpfelwein, in Flaschen vergoren (am 8. Dez. 1910) . . .	3,88	0,52	3,31	5,22	—	—	—
Äpfelwein, im Faß verg. (am 20. Dez. 1910)	8,44	0,29	8,12	—	0,82	37,92	27,4
„ „ „ „ (6. März 11)	8,34	—	—	—	—	—	—
„ „ „ „ (27. April)	8,30	—	—	—	—	—	—
„ „ „ „ (1. Juni)	8,37	—	—	—	—	—	—
„ „ „ „ (10. Juli)	7,83	—	—	—	—	—	—
„ „ „ „ (14. Aug.)	4,22	—	—	—	—	—	—

Der Einfluß der Temperatur auf die säureverzehrenden Bakterien tritt hier sehr deutlich hervor, indem bei 16° 3—4 Wochen genügten, den Säure-

abbau zu Ende zu führen. Im Keller hat dagegen die niedere Temperatur die Entwicklung der Bakterien vollständig gehemmt und erst bei Eintritt der wärmeren Jahreszeit, als auch die Temperatur des Kellers merklich stieg, konnte hier der Säureabbau beginnen. Im Trub fanden sich Bakterien vom Aussehen des *Bacterium gracile*. Da der Apfelwein in den Fässern am 30. Dezember 1910 von der Hefe abgezogen wurde, könnte man vielleicht vermuten, es hätte dieser Umstand so stark hemmend auf den Säureabbau eingewirkt, d. h. es hätten in diesem Apfelwein die Bakterien ohne Trub nicht gut wachsen können. Allein ein Nebenversuch, bei dem nach dem Abzuge dem klaren aus dem Fasse entnommenen und in Gärfaschen abgefüllten Wein das reingezüchtete *Bacterium gracile* zugesetzt wurde, lieferte den Gegenbeweis. Das *Bacterium* wuchs in diesem Wein bei 19° sehr gut und vermochte die Säure im Verlauf von 6 Wochen vollständig abzubauen.

Da ein hoher Säuregehalt des Weines für die Vermehrung der Bakterien ungünstig ist, erscheint es von Interesse, den spontanen Säureabbau auch in einem säurereichen Obstwein zu beobachten.

Ein von uns zu Versuchszwecken benützter Apfelsaft (von Weinäpfeln) besaß 12,93‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure). Er wurde am 21. Oktober teils in Fässern à 6 Hektoliter im Keller, teils in Flaschen à 500 cm in einem Raum von 16° zur Vergärung gebracht.

Tabelle 74.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Äpfelsaft, unvergoren	12,93	0,12	12,80	0,61	93,6	—	134,5
Äpfelwein, in Flasch., verg. (21. Nov. 1910)	12,93	0,47	12,41	0,66	2,49	43,32	34,0
„ „ (8. Dez. 1910)	12,06	—	—	—	—	—	—
„ „ (1. Febr. 1911)	7,43	0,88	6,46	5,84	—	—	—
„ „ (3. Apr. 1911)	5,69	0,84	4,76	6,56	—	—	—
Äpfelwein im Faß vergoren (11. Febr. 1911)	12,06	0,36	11,66	0,66	3,25	42,36	32,1
„ „ „ (13. Sept. 1911)	11,86	—	—	—	—	—	—
„ „ „ (30. Dez. 1911)	12,26	—	—	—	—	—	—
„ am 30. Dez. aus dem Faß in Flaschen gefüllt, bei 19° aufbewahrt und am 5. Juni 1912 untersucht	7,84	0,66	7,11	5,62	—	—	—

Nach einem Monat, am 21. November, war bei den in Flaschen befindlichen Weinen die Gärung abgeschlossen. Der Säureabbau verlief hier jedoch beträchtlich langsamer als bei dem säureärmeren Dohuber Apfelwein. Nach 10 Wochen war er zwar schon stark vorgeschritten, aber noch nicht beendet. Trotz der günstigen Temperatur und der Anwesenheit des Trubes haben die Bakterien verhältnismäßig langsam sich entwickelt und Säure zersetzt. Bei dem in den Fässern liegenden Apfelwein kam nun zu diesem durch die Säure ausgeübten hemmenden Einfluß noch die niedere Temperatur hinzu, sowie der Umstand, daß der Obstwein nach abgeschlossener

Alkoholgärung vom Trub abgezogen wurde, also ohne solchen lagerte. Dem Zusammenwirken dieser 3 Faktoren wird es wohl zuzuschreiben sein, daß der Säureabbau im Keller während eines ganzen Jahres ausblieb. Am 30. Dezember 1911 wurde von diesem Apfelwein in Flaschen gefüllt und diese bei 19° im Laboratorium aufgestellt. Jetzt machte sich, ohne daß Bakterien zugesetzt worden waren, der Säureabbau deutlich bemerkbar und die Bakterien vermochten, wenn auch nur langsam, die Säure zu zersetzen, so daß der Abbau im Juni des folgenden Jahres fast beendet war. Sowohl in diesen Flaschen als auch in den ursprünglich aufgestellten Versuchsfaschen fanden sich zahlreiche Bakterien in Form von zarten zu Flöckchen vereinigten Fäden; nach ihrer Gestalt und Größe, sowie auch nach ihrer Wirksamkeit zu urteilen, gehören sie zu *Bacterium gracile*.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß durch den Zusatz einer kräftig wirkenden Reinhefe die Gärung in einem Wein oder Obstwein reiner gestaltet werden kann, indem andere Organismen wie z. B. Bakterien in ihrer Entwicklung gehemmt werden. Ob aber die Reinhefe einen hemmenden Einfluß auf den Säureabbau ausüben kann, ist eine andere Frage, da ja zwischen Hefe und säureabbauenden Bakterien keine Nahrungskonkurrenz eintritt wie z. B. zwischen Hefen und den Bakterien des Milchsäurestichs, die beide sich des Zuckers bemächtigen wollen. Den den Säureabbau besorgenden Bakterien verbleibt ja trotz einer energischen, durch Reinhefezusatz unterstützten Gärung die Äpfelsäure erhalten. Immerhin schien es geboten, einen Versuch auch in dieser Richtung anzustellen.

Ein Apfelsaft (aus Weinäpfeln) wurde am 12. Oktober in 6 Hektoliter-Fässern zur Vergärung gebracht und zwar in einem Fasse ohne Zusatz von Reinhefe, in einem zweiten, genau gleich gefüllten, mit einem größeren Zusatz (1 Proz.) einer vorher frisch vermehrten Reinhefe (Rütti 2).

Tabelle 75.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Alkohol g im l
Apfelsaft, unvergoren	7,30	0,09	7,20	—
Äpfelwein, mit Eigenhefe allein vergoren (unters. 23. Jan.)	7,23	0,17	7,04	51,04
„ mit Eigenhefe + Reinhefe vergoren (unters. 23. Jan.).	4,55	0,21	4,32	49,26
Äpfelwein, mit Eigenhefe allein vergoren (unters. 17. Juli)	4,42	0,44	3,94	—
„ mit Eigenhefe + Reinhefe vergoren (unters. 17. Juli)	3,51	0,46	3,00	—

Nach Verlauf von 3 Monaten zeigte der mit Zusatz von Reinhefe vergorene Apfelwein bereits einen starken Säureabbau, während die Säure in dem ohne Reinhefezusatz vergorenen noch unverändert war. Bei einer zweiten, am 17. Juli vorgenommenen Untersuchung war dann allerdings auch in diesem letzteren Wein der Säureabbau weit vorgeschritten; der mit Reinhefe vergorene zeigte aber noch zu dieser Zeit einen kleinen Vorsprung. Der Reinhefezusatz hat also in diesem Falle den Säureabbau nicht gehemmt, sondern gefördert, vielleicht deshalb, weil die alkoholische Gärung früher beendet war.

Da die Urteile über den Einfluß des Säureabbaues auf die Qualität der Weine noch auseinandergehen, dürfte es von Interesse sein, hier das Resultat der Kostprobe der beiden Weine anzuführen. Am 23. Januar erschien der mit Reinhefezusatz vergorene Apfelwein von reinem mildem Geschmack, während der ohne Reinhefe, in welchem der Säureabbau noch nicht stattgefunden hatte, unbedingt zu sauer schmeckte, so sauer, daß er sich kaum zum direkten Konsum, dagegen eher zum Verschnitt mit milden Obstweinen geeignet hätte. Am 17. Juli schmeckten beide Weine rein, angenehm und mild, der mit Reinhefe noch etwas milder als der andere. Es hat der Säureabbau hier offenbar günstig auf die Qualität des Weines eingewirkt.

Die Annahme liegt nahe, man könnte in solchen Fällen, wo ein Säureabbau unerwünscht ist, ihn durch Zufuhr von schwefliger Säure verhindern, sei es durch Einbrennen des Weines oder durch Zusatz von Kaliummetasulfit oder schwefliger Säure. Es fehlen aber bis jetzt genaue experimentelle Beweise hierfür. Es dürften deshalb die Ergebnisse eines in dieser Richtung ausgeführten Versuches hier am Platze sein.

Ein frisch abgepreßter Apfelsaft wurde vor der Gärung teils mit 225 mg Kaliummetasulfit pro Liter versetzt, teils ohne solchen Zusatz gelassen. Eine bald vorgenommene Bestimmung ergab 111,4 mg gesamte schweflige Säure pro Liter. Die Gärung verlief bei dem mit schwefliger Säure versehenen Apfelsaft fast ebenso schnell wie bei dem anderen. Im Säureabbau zeigte sich aber ein großer Unterschied, wie aus nachfolgender Tabelle ersichtlich ist.

Tabelle 76.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Äpfelwein, direkt nach der Gärung 14. Nov. 1911 . . .	9,48	0,47	8,96	0,60	1,51	52,90	26,7
Äpfelwein, ohne schweflige Säure, am 20. Jan. 1912 . .	3,71	0,66	2,98	6,46	—	54,22	—
„ mit schwefliger Säure, am 20. Jan. 1912 . .	8,98	0,66	8,25	0,72	—	52,24	—
Äpfelwein, ohne schweflige Säure, am 23. Mai 1912 . .	4,02	0,60	3,36	—	—	—	—
„ mit schwefliger Säure, am 23. Mai 1912 . .	8,37	0,71	7,59	—	—	—	—
„ mit schwefliger Säure, am 3. Juli 1912 . .	3,95	—	—	—	—	—	—

Die Versuchsgefäße mit diesen Weinen standen bei 15°. In dem ohne Sulfitzusatz belassenen Wein hat innert 2 Monaten, bis zum 20. Januar, ein vollständiger Abbau der Säure stattgefunden, während zu dieser Zeit im Weine mit Sulfitzusatz die Bakterien die Säure noch nicht angegriffen hatten. Die geringe Säureabnahme von 0,5°/∞ ist anderen Vorgängen zuzuschreiben. Selbst am 23. Mai, also 4 Monate später, war in dem Weine mit schwefliger Säure nur eine schwache Säureabnahme bemerkbar, die wir hier nun allerdings auf Bakterieneinwirkung zurückführen möchten, weil

von nun an ein Säureabbau durch solche sicher stattfand, wie die Untersuchung am 3. Juli erkennen läßt. Als Hauptresultat geht aus diesem Versuch unzweifelhaft hervor, daß durch Zusatz von schwefliger Säure der Säureabbau zurückgehalten werden kann, auch wenn sie schon vor der Gärung zugefügt wird. Im vorliegenden Falle haben ca. 110 mg schweflige Säure pro Liter genügt, um den Säureabbau während eines halben Jahres zu verhindern, trotz der für diesen Vorgang günstigen Temperaturverhältnisse und des Lagerns der Obstweine auf dem Hefetrub. In Fässern im Keller würde die gleiche Menge schwefliger Säure wohl ausgereicht haben, um den Obstwein dauernd vor dem Abbau zu schützen, zumal wenn ihre Wirkung durch einen rechtzeitigen Abzug noch unterstützt worden wäre. Eine größere Menge von schwefliger Säure (222 mg pro Liter), die in dem betreffenden Obstsaft die Gärung noch nicht zu verhindern vermochte, genügte, den Säureabbau auch unter den hierfür in den Flaschen obwaltenden günstigen Verhältnissen daurend zu verhindern.

Auch bei diesem Versuche fanden sich im Trub der Weine mit Säureabbau die zarten Fäden und diplokokkenartigen Stäbchen, wie wir sie vom *Bacterium gracile* her kennen und zwar, nach dem mikroskopischen Befund zu urteilen, ohne Beimengung anderer Bakterien. Trotz der großen Menge neugebildeter Milchsäure haben diese Bakterien beim Abbau der Äpfelsäure wiederum keine flüchtige Säure gebildet; die geringe Zunahme (0,19‰) kann wohl auf die Tätigkeit der im Trub befindlichen Hefezellen zurückgeführt und zu einem kleinen Teile als Produkt von Stoffwechselvorgängen der Bakterien betrachtet werden.

Da bei säurereichen Weinen und Obstweinen die Qualität durch einen richtigen Säureabbau (mit Ausschluß der Bildung flüchtiger Säure) gehoben werden kann, so wäre es in manchen Fällen erwünscht, denselben zu begünstigen oder geradezu künstlich herbeizuführen. Einige Versuche, letzteres durch Zusatz von reingezüchteten Bakterien zu erzielen, mögen hier kurz erwähnt werden.

Ein 1910er Apfelwein (Dohuber Wildling), der sich in 2 Fässern à 6 Hektoliter befand, hatte am 9. März 1911 noch keinen Säureabbau erlitten. Es wurde nun dem Inhalt des einen Fasses 1 l einer Reinkultur von *Bacterium gracile* w im gleichen Obstwein zugefügt, während das zweite Faß keinen Bakterienzusatz erhielt. Von Zeit zu Zeit untersuchte man die beiden Apfelweine auf den Säuregehalt.

	Mit Zusatz von <i>Bacterium gracile</i> w	Ohne Bakterienzusatz
am 9. März 1911	8,44‰ Äpfelsäure	9,04‰ Äpfelsäure
am 22. April 1911	8,30‰ „	8,81‰ „
am 1. Juni 1911	8,37‰ „	8,84‰ „
am 10. Juli 1911	7,83‰ „	8,84‰ „
am 4. August 1911	4,22‰ „	4,35‰ „

Wie sich aus diesen Zahlen ersehen läßt, enthielt der ursprüngliche Apfelwein schon äpfelsäureverzehrende Bakterien und es kam das zuge setzte *Bacterium gracile* w kaum zur Geltung. Zur Zeit der Aussaat war die Temperatur für die Weiterentwicklung der Bakterien zu niedrig und als dann im Monat Juli die Temperatur im Keller stieg, vermochten

sich die schon von Anfang an vorhandenen Bakterien so rasch zu vermehren, daß der Zusatz der Reinkultur keinen großen Einfluß mehr ausüben konnte. Daß die bei diesem Versuch verwendete Reinkultur von *Bacterium gracile* nicht etwa zu alt war, sondern sich in lebenskräftigem Zustand befand, wurde noch besonders nachgewiesen, indem man einem vorher sterilisierten Apfelwein (Weinapfelwein) mit ca. 12‰ Gesamtsäure (Äpfelsäure) in Flaschen eine entsprechende Menge von der gleichen Reinkultur des *Bacterium gracile* w zusetzte. In diesem allerdings dann bei 19° stehenden Apfelwein trat der Säureabbau schon innert 3 Wochen ein und nach Ablauf von 5 Wochen betrug der Gehalt an Gesamtsäure nur noch 6,09‰ und derjenige an Milchsäure 7,74‰.

Hier mag noch ein Versuch mit Traubenweinen angeschlossen werden. Im Herbst 1911 (anfangs Oktober) füllte man Traubensäfte (von Gutedel, Sylvaner und Clävner) in Flaschen ab; der Clävnersaft erhielt einen entsprechenden Zusatz von Beerenhäuten. Ein Teil der so beschickten Flaschen wurde ohne weiteres der spontanen Gärung überlassen, während man bei den anderen vorher noch Reinkulturen von Bakterien zufügte und zwar von *Bacterium manniopœum* f; *Bacterium gracile* a; *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* h. Die Gärflaschen standen bei durchschnittlich 15°. Am 22. Dezember zeigten die spontan ohne Bakterienzusatz vergorenen Weine folgende Zusammensetzung:

Tabelle 77.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Extrakt g im l
Sylvanerwein, unvergoren	10,14	0,22	9,90	0,54	166,49	210,9
„ spontan vergoren	8,60	0,55	7,99	0,54	—	—
Gutedelwein, unvergoren	7,74	0,25	7,46	0,50	145,80	177,4
„ spontan vergoren	6,17	0,41	5,72	2,06	—	—
Clävnerwein, unvergoren	8,87	0,22	8,63	0,72	178,30	224,3
„ spontan vergoren	4,47	0,57	3,84	3,20	—	—

Bei sämtlichen Weinen hat die Gesamtsäure abgenommen, allein nach der Milchsäurebildung zu urteilen fand nur im Gutedel- und Clävnerwein ein Säureabbau durch Bakterien statt. Beim Gutedelwein betrug die Abnahme der nicht flüchtigen Säure 1,74‰; das gibt uns aber nicht an, wieviel Äpfelsäure wirklich verschwunden ist, denn in den 5,7‰ noch vorhandener Säure findet sich auch neugebildete Milchsäure. Nach dieser letzteren zu schließen, betrug der Säureabbau etwa 2,2‰, beim Clävnerwein ist derselbe weiter vorgeschritten, wie aus der größeren Menge Milchsäure hervorgeht und übrigens auch aus der Abnahme an nicht flüchtiger Säure zu ersehen ist. Anders ist das Verhalten des Sylvanerweines. Wohl läßt sich auch hier eine Abnahme der Säure erkennen. Da jedoch keine Milchsäure gebildet wurde, rührt, wie schon erwähnt, die Abnahme von 1,5‰ nicht etwa von einem Säureabbau durch Bakterien her. Sie wird verursacht worden sein teils durch Weinsteinabscheidung, die auch wirklich

beobachtet wurde und ferner vielleicht mit einem geringeren Säureverbrauch durch die im Trub befindliche Hefe zusammenhängen.

Merkwürdigerweise verhielten sich nun die Weine, denen vor der spontanen Gärung Reinkulturen unserer Bakterien zugefügt worden waren, in ganz gleicher Weise wie die in Tabelle 77 erwähnten.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Milchsäure g im l
Sylvanerwein + <i>Mic. variococcus</i>	8,47	0,60	0,54
Gutedelwein + <i>Bact. gracile</i> a	6,14	0,57	2,02
Gutedelwein + <i>Mic. variococcus</i>	6,14	0,65	2,34
Clävnerwein + <i>Bact. mannitolpæum</i> f . . .	4,55	0,62	3,16

Bei jedem der 3 Weine wurde der Versuch mit unseren 4 Bakterien ausgeführt, allein zur Untersuchung wählte man von jedem Wein nur 1 bis 2 Flaschen, die verhältnismäßig viel Bakterien im Trub zu enthalten schienen. Da nun diese Weine trotz der Bakterienaussaat genau die gleichen Veränderungen zeigten wie die ohne solche, so kann daraus geschlossen werden, daß der Säureabbau, wo ein solcher stattfand, in der Hauptsache durch die schon im Saft vorhandenen Bakterien verursacht wurde und die zugesetzten Bakterien wahrscheinlich nur eine geringe Rolle spielten. Es ist nicht ausgeschlossen, daß, wenn man die Weine früher untersucht hätte, diejenigen mit Bakterienzusatz sich im Säureabbau etwas vorgeschrittener gezeigt haben würden. Für die praktische Seite der Frage käme diesem Umstand keine große Bedeutung zu. Beim Clävner- und Gutedelwein war der Säureabbau zur Zeit der Untersuchung fast vollständig abgeschlossen. Dementsprechend veränderten sich die Weine bei weiterem Stehenbleiben (bis Anfangs Juni 1912) nicht mehr wesentlich. Anders verhielt sich der Sylvaner, der am 22. Dezember 1911 noch keinen Säureabbau erkennen ließ. Bis anfangs Juni sank hier der Säuregehalt auf 6,37‰. Es war nun ebenfalls Säureabbau eingetreten und zwar in genau gleicher Weise, da, wo man je eines der 4 Bakterien zusetzte, oder wo kein Bakterienzusatz erfolgte.

Wenn wir im Nachfolgenden die wichtigeren Ergebnisse über den Säureabbau kurz zusammenfassen, so möchten wir in erster Linie hervorheben, daß der Nachweis des Säureabbaues in allen jenen Fällen leicht zu erbringen ist, wo man den ursprünglichen Gehalt des Weines an flüchtiger und nicht flüchtiger Säure kennt. Schwieriger wird die Beurteilung, wenn man nur den abgebauten Wein vor sich hat. Doch ist auch in diesem Fall sicher auf Säureabbau zu schließen, wenn der Wein neben einem geringen Gehalt an flüchtiger Säure ziemlich viel (z. B. 2 oder mehr ‰) Milchsäure enthält. Findet sich aber neben dieser Milchsäure eine erhebliche Menge flüchtiger Säure, so ist dann die Beurteilung unter Umständen schwierig. Es kann die Milchsäure beim Säureabbau entstanden und die Essigsäure das Produkt von Essigbakterien oder Kahlhefen sein. Es könnte aber ebenso gut kein Säureabbau stattgefunden haben, sondern Milchsäureestich eingetreten sein, wobei neben Milchsäure Essigsäure entsteht. Zum Nachweis, ob Säureabbau stattgefunden hat, wird die mikroskopische Untersuchung

wesentlich beitragen, indem man entweder den aus dem Faß entnommenen Trub untersucht oder, falls dies nicht angängig ist, den betreffenden Wein in der gut verschlossenen Flasche kühl stellt, einige Tage stehen läßt und dann mit einer kapillar ausgezogenen Glasröhre den feinen Bodensatz sammelt. In Weinen mit Säureabbau wird man nun Bakterien in großer Zahl finden und zwar die zarten Fäden und Stäbchen des *Bacterium gracile* oder die Einzelkokken, Diplokokken und Tetraden der beschriebenen *Micrococcus*-Arten (*Micrococcus malolacticus* Seifert, *Micrococcus acidovorax* n. sp., und *Micrococcus variococcus* n. sp.). Findet man dagegen in einem Wein mit ziemlich viel Milchsäure und flüchtiger Säure das *Bacterium mannitolopæum*, so dürfte man meist Milchsäurestich vor sich haben, womit nicht gesagt sein soll, daß dieses *Bacterium* unter Umständen in Weinen nicht auch Äpfelsäure abzubauen vermag.

Der Grad des Säureabbaues ist bei den verschiedenen Weinen ungleich. Bei den Obstweinen, besonders den Apfelweinen, werden beim Säureabbau häufig solche Mengen von Milchsäure gebildet wie man sie bei Traubenweinen höchst selten beobachtet. Es ist dies dem Umstande zuzuschreiben, daß die Säure der Obstweine fast ausschließlich aus Äpfelsäure besteht, während in Traubenweinen stets auch Weinsäure, teils frei, teils in Form von saurem, weinsaurem Kalium (Weinstein) sich vorfindet, die, wie wir genau nachgewiesen haben, von sämtlichen unserer Bakterien nicht abgebaut wird. Aus dem gleichen Grunde zeigten denn auch Weine verschiedener Beschaffenheit hinsichtlich des Säureabbaues beträchtliche Unterschiede. Die einen besitzen eben relativ mehr, die anderen weniger Weinsäure.

Aus der gefundenen Milchsäure kann in einem Wein, der nur wenig flüchtige Säure enthält, in dem also nur Säureabbau stattfand, die Menge der abgebauten Äpfelsäure annähernd berechnet werden, indem aus 100 Teilen Äpfelsäure ungefähr 60—65 Proz. (theoretisch 67 Proz.) Milchsäure entstehen. Die beim Säureabbau gebildete Milchsäure findet sich im Wein nicht nur in freier Form, sondern sie kann auch z. T. in Form milchsaurer Salze vorkommen. Es wird dies namentlich dann der Fall sein, wenn der Wein vor dem Abbau äpfelsaure Salze enthielt.

Oft macht sich der Säureabbau durch augenfällige Erscheinungen bemerkbar. Die dabei entstehende Kohlensäure erzeugt nicht selten ein Moussieren des Weines und kann in geschlossenen Fässern einen bedeutenden Kohlensäuredruck herbeiführen, Erscheinungen, die man schon länger kennt und als „Pousse“, „Versieden“ der Weine bezeichnet hat. Gleichzeitig wird der Wein auch durch die zahlreichen Bakterien mehr oder weniger getrübt.

Die Zeit des Säureabbaues ist je nach den Umständen verschieden. In warmen Herbstes und bei säureärmeren Getränken beginnt der Säureabbau schon sofort oder bald nach der Gärung und ist in wenigen Wochen beendet. Man spricht in solchen Fällen oft von einer Nachgärung und hat bisher häufig angenommen, daß die nachträglich auftretende Kohlensäureentwicklung einer erneuten Hefetätigkeit zuzuschreiben sei, ein Irrtum, der wohl darauf zurückzuführen ist, daß die beim Säureabbau entstehende Kohlensäure auch abgesetzte Hefe aus dem Trub mit in die Höhe reißt. Bei kühl lagernden Getränken, zumal, wenn sie viel Säure enthalten, tritt der Säureabbau nicht so rasch ein und macht sich dann oft erst bei Beginn

des nächsten Sommers, wenn die Kellertemperatur steigt, als sog. „Stoßen des Weines“ bemerkbar. Es wird dann der Vorgang nicht selten mit dem Blühen der Reben zusammentreffen und in der Tat besteht bei vielen Praktikern die Anschauung, daß zu dieser Zeit die Weine „wieder zu arbeiten“ beginnen, worauf auch schon P a s t e u r hingewiesen hat, der die Erscheinung als P o u s s e bezeichnete.

Die Folgen des Säureabbaues sind verschiedenartige, je nach der Beschaffenheit des Weines. Sie können für dessen Qualität günstig sein, in anderen Fällen aber seinen Wert bedeutend herabsetzen. Günstig wird der Einfluß namentlich dann sein, wenn der ursprüngliche Säuregehalt zu hoch ist. Da derselbe fast auf die Hälfte herabgesetzt werden kann, werden solche Weine nachher schon aus diesem Grunde und auch wegen des milden Geschmacks der Milchsäure bedeutend weniger sauer schmecken und doch noch genügend Säure enthalten, um im Geschmack harmonisch zu erscheinen und andererseits gegen Schädigungen geschützt zu sein. Die Befürchtung, der Geschmack des Weines könnte infolge der Umwandlung der Äpfelsäure in Milchsäure unrein werden, ist bei reinem Säureabbau nicht begründet, wohl aber, wenn anderweitige Umsetzungen nebenbei verlaufen, wie z. B. die Bildung flüchtiger Säuren. Dagegen scheint uns die öfters geäußerte Ansicht, daß ein Wein mit unzersetzter Äpfelsäure angenehmer schmecke als ein solcher, in dem diese (bei gleichem Säuregrad) durch Milchsäure ersetzt ist, nicht genügend begründet zu sein. Auf Grund unserer Erfahrung glauben wir nicht, daß nach dieser Richtung hin der Säureabbau den Wert des Weines beeinträchtigt. Die von M. R i p p e r (1; p. 26) im Anschluß an die Arbeiten von M e t s c h n i k o f f geäußerte Ansicht, daß der im Weine vorhandenen Milchsäure eine besondere gesundheitliche Bedeutung zukomme, möge hier nur kurze Erwähnung finden.

In manchen Fällen ist aber der Säureabbau unzweifelhaft nachteilig, so namentlich dann, wenn die Weine schon anfänglich wenig Säure enthalten, wie dies bei vielen Rotweinen der Fall ist, sodann bei den Weißweinen mancher Rebsorten und Weingegenden. Infolge des genannten Vorganges erscheinen solche Weine dann fade, flach und unharmonisch im Geschmack. Dasselbe ist auch der Fall bei milden Obstweinen. Da man säurereiche Obstweine oft ihres Säuregehaltes wegen höher schätzt, weil sie zum Verschnitt mit säurearmen geeignet sind, so kann unter Umständen auch hier der Säureabbau den Wert ungünstig beeinflussen.

Der Säureabbau in anfänglich säurearmen Getränken beeinträchtigt nicht nur ihren Geschmack, sondern hat auch noch andere nachteilige Folgen, unter denen eine geringere Widerstandsfähigkeit gegen durch bakterielle Krankheiten in erster Linie anzuführen ist. Ferner konnten wir oft beobachten, daß Obstweine, die vor dem Säureschwund luftbeständig waren, nach demselben bei Luftzutritt die Erscheinungen des S c h w a r z w e r d e n s in ausgeprägtem Maße zeigten, was verständlich ist, weil durch den Abbau nicht nur der Säuregehalt herabgesetzt wird, sondern auch an Stelle der Äpfelsäure Milchsäure trat, die nicht in gleichem Maße befähigt ist, dem Schwarzwerden entgegenzuwirken. Auch bei Traubenweinen tritt ein ähnlicher Vorgang ein. Oft aber bemerkt man bei diesen nur ein Dunklerwerden des Farbentones und nicht ein eigentliches Schwarzwerden. Namentlich scharf tritt diese Veränderung der Farbe bei Rotweinen hervor, wo z. B. der schön rubinrote Farbenton in eine bläulich-schwärzlich-rote Färbung übergeht. Nicht selten geht aber die Einwirkung

noch weiter; es bleibt nicht mehr aller Farbstoff gelöst, sondern er scheidet sich zum Teil aus und verursacht eine Trübung und schokoladebräunliche Färbung des Weines, ähnlich derjenigen, die bei braungewordenen Rotweinen beobachtet werden kann.

Diese hier geschilderten Erscheinungen des Säureabbaues zeigen eine auffallende Übereinstimmung mit denjenigen, die von französischen Forschern für die sog. „Pousse“ und „Tourne“ der Weine angegeben werden, welche beiden Erscheinungen manche Forscher als übereinstimmend betrachten. Mit der „Pousse“ würde der Säureabbau in säurereicheren Getränken übereinstimmen, während die Folgen des Säureabbaues bei säureärmeren Weinen, wenigstens in den äußeren Erscheinungen, an „Pousse“ und „Tourne“ erinnern. Wenn die französischen Forscher annehmen, daß es sich bei der „Pousse“ und „Tourne“ um eine Umsetzung von Weinstein unter Bildung von Propionsäure handle, so unterliegt andererseits doch keinem Zweifel, daß mit diesen Erscheinungen die eben erwähnten ähnlichen des Säureabbaues in gewissen Weinen häufig zusammengefaßt wurden.

In den Fällen, wo ein Säureabbau nicht erwünscht ist, läßt sich demselben einigermaßen entgegenwirken durch kühle Lagerung der Getränke, frühzeitigen Abzug vom Hefetrub, durch Zufügung von Kaliummetasulfit oder Einbrennen mit Schwefel. Durch frühzeitigen Zusatz von Säure, soweit ein solcher gesetzlich erlaubt ist, läßt sich der Säureabbau ebenfalls verhindern; doch wäre hierzu meist eine starke Erhöhung des Säuregehaltes erforderlich. Eher könnte man daran denken, durch einen Säurezusatz ungünstige Folgen des Säureabbaues auszuschließen. Äpfelsäure dürfte sich für diese Zwecke weniger eignen, da sie ja durch gewisse Bakterien abgebaut wird. Sie kommt übrigens auch ihres hohen Preises wegen nicht in Betracht. Von einem Zusatz von Zitronensäure, der gelegentlich empfohlen wird, möchten wir direkt abraten, da dieselbe von den Bakterien leicht abgebaut wird und zwar unter Bildung von viel flüchtiger Säure. Am besten würde sich für diesen Zweck Weinsäure eignen. Infolge ihrer weitgehenden Dissoziation wirken schon geringere Mengen der Bakterienentwicklung entgegen und andererseits bleibt die zugesetzte Weinsäure in ihrer Totalität im Weine erhalten. Auch der Umstand, daß Gerbstoff hemmend auf den Säureabbau einwirken kann, läßt sich in der Technik der Wein- und Obstweinbehandlung nutzbar machen.

Nicht selten werden Weine, in denen der Säureabbau beginnt, und die infolgedessen sich etwas trüben, „sich stoßen“, geschönt, um diesen Übelstand zu beseitigen. Nachdem über den Vorgang und die Ursachen des Säureabbaues genügend Aufschluß geschaffen ist, wird man die Zwecklosigkeit dieses Verfahrens sofort einsehen. Es gelingt durch die Schönung nicht, sämtliche Bakterien zu entfernen und so werden die übrig bleibenden, falls die Weine noch nicht vollständig abgebaut sind, sich vermehren und weiter arbeiten.

In den Fällen, in denen ein Säureabbau erwünscht ist, wird man natürlich die eben erwähnten, denselben hemmenden Einflüsse zu vermeiden suchen; vor allem wird man zur Erreichung des Zieles beitragen können durch eine höhere Temperatur der Getränke bald nach der Gärung. Die Entscheidung der Frage, ob es möglich sei, durch Zusatz von Bakterien-Reinkulturen den Säureabbau im großen durchzuführen, wo er nicht von selbst eintritt, muß weiteren Versuchen überlassen werden.

2. Milchsäurestich und Mannitgärung.

Schon im Überblick über die bisherigen Kenntnisse der Weinkrankheiten haben wir den Milchsäurestich in seinem Wesen zu charakterisieren gesucht (p. 133). Wie dort hervorgehoben wurde, tritt diese Krankheit in Traubenweinen nördlicher Gegenden seltener auf wegen des höheren Säuregehaltes. In viel höherem Grade sind ihr die milden Traubenweine, dann aber ganz besonders die säurearmen Birn- und milden Apfelweine ausgesetzt. Da bei diesen der Milchsäurestich in seinen typischen Formen leichter zu studieren ist, mögen erst Beispiele von milchsäurestichigen Obstweinen angeführt werden und daran sich dann einige von Traubenweinen anschließen.

Ein aus teilweise teigen Theilersbirnen hergestellter Birnwein zeigte nach der Vergärung die Erscheinung des Milchsäurestiches, den charakteristischen Geruch und die eigentümliche weißliche Trübung. Der von Bakterien stark durchsetzte Hefetrub enthielt diese in Form von Stäbchen und langen, zu kugeligen Flocken vereinigten Fäden von ca. 1 μ Durchmesser. (Aus diesem Trub wurde unser *Bacterium mannitopœum* k gezüchtet.) Der Birnwein enthielt in diesem Zustande:

5,36°/∞	Gesamtsäure als Äpfelsäure
2,34°/∞	flüchtige Säure als Essigsäure
2,69°/∞	nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure
5,17°/∞	Milchsäure und
2,79°/∞	Mannit.

Gestützt auf die große Menge von Milchsäure könnte man an einen Säureabbau denken; allein der hohe Gehalt an flüchtiger Säure weist darauf hin, daß hier ausschließlich oder neben einem Säureabbau ein anderer Vorgang stattgefunden hat, und zwar kann dies nicht gut etwas anderes sein als die Umsetzung von Zucker, die nach unseren Feststellungen durch das *Bacterium mannitopœum* stets unter Bildung von Milchsäure und viel flüchtiger Säure stattfindet. Daß hier wirklich Zucker abgebaut wurde, ist auch aus dem Gehalt an Mannit zu schließen. Weil die Milchsäure jedenfalls zu einem wesentlichen Teil vom Abbau des Zuckers herrührt, was aus der Essigsäuremenge geschlossen werden kann, so muß sie in diesem Obstweine auch zum größten Teil in nicht gebundener Form sich finden. Wenn dem aber so ist, dann wird die nicht flüchtige Säure zum größten Teil aus Milchsäure bestehen, m. a. W. die ursprüngliche Äpfelsäure ist abgebaut worden, wozu *Bacterium mannitopœum* nach unseren Untersuchungen ja befähigt ist. Es haben also in diesem Obstweine zwei Vorgänge stattgefunden, die man ganz wohl voneinander trennen kann, nämlich 1. die Erzeugung des eigentlichen Milchsäurestiches durch Abbau von Zucker unter Bildung von Milchsäure und viel Essigsäure und

2. der Abbau von Äpfelsäure, der im vorhergehenden Abschnitt eingehend behandelt wurde. Der im Weine nachgewiesene Mannit steht im Zusammenhang mit dem Milchsäurestich, denn er wird beim Abbau des Zuckers gebildet, allein es braucht nicht jeder Milchsäurestich mit Mannitbildung verbunden zu sein, denn nur bei Anwesenheit von Lävulose wird diese Substanz gebildet. Folgende Beobachtung spricht hierfür.

Aus gut ausgereiften Reinholzbirnen wurde ein Birnsaft hergestellt, der mild und nicht herb schmeckte. Der spontanen Gärung überlassen, zeigte er schon früh einen ausgeprägten Milchsäurestich, der sich durch den charakteristischen Geruch und Geschmack kennzeichnete. Im Hefetrub fanden sich neben ca. 90 Proz. Zellen vom *Saccharomyces ellipsoideus* ca. 5—10 Proz. solche von *Saccharomyces apiculatus* und sehr viele Bakterien, teils als Stäbchen, teils in knäueiförmig vereinigten langen Fäden, die nach Aussehen und Dicke zu *Bacterium mannitopœum* gehörten. Die Zusammensetzung des unvergorenen Saftes und des vergorenen Weines war folgende:

Tabelle 78.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Gesamt- zucker als Invertzucker	Alkohol	Extrakte
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Unvergorener Birnsaft (27. Okt. 1911)	4.62	0.55	4.02	0.54	151.74	—	210.3
Birnwein (28. November)	4.96	2.87	1.80	5.10	11.33	64.56	50.4
Birnwein (14. März 1912)	5.96	3.25	2.39	6.08	—	—	—

Es liegt hier wiederum ein ausgeprägter Fall von Milchsäurestich vor. Schon vor Beendigung der Gärung ist durch die Bakterien ein Teil des Zuckers in Milchsäure und Essigsäure zerlegt worden. Während wir im vorigen Beispiel durch Rechnung feststellen konnten, daß neben dem Milchsäurestich auch ein Säureabbau stattfand, können wir dies hier, wo die Zusammensetzung des ursprünglichen Saftes bekannt ist, direkt erkennen. Ursprünglich waren 4,02 ‰ nicht flüchtige Säure (als Äpfelsäure) vorhanden; am 28. November finden sich nur noch 1,80 ‰ nicht flüchtige Säure; also ist zum mindesten die Differenz abgebaut worden, und da die nicht flüchtige Säure mit Ausnahme von etwas Bernsteinsäure Milchsäure ist, so kann wohl angenommen werden, daß alle Äpfelsäure abgebaut wurde. Der Gehalt an Mannit wurde in diesem Falle allerdings nicht direkt bestimmt, allein bei der Extraktbestimmung des vergorenen Weines traten die charakteristischen Kristalldrusen dieser Substanz nicht auf. Auch läßt sich rechnerisch feststellen, daß erhebliche Mengen von Mannit nicht gebildet werden konnten. Aus dem verschwundenen Zucker (140 g) hätten ca. 67,2 g Alkohol entstehen können. Nun fanden sich aber im Wein 64,56 g. Bedenkt man nun, daß ein Teil dieses Zuckers noch in Milchsäure und Essigsäure umgesetzt wurde, so erhellt, daß jedenfalls nur geringe Mengen von Zucker für Mannitbildung verwendet worden sein konnten.

Nun sind wir zurzeit nicht in der Lage zu erklären, warum hier bei doch ziemlich starker Bildung von flüchtiger Säure kein oder nur wenig Mannit entstanden ist. Wir möchten aber auf die Möglichkeit hinweisen, daß Dex-

trose abgebaut wurde, die ja keinen Mannit liefert, oder daß der Obstsaft Pentosen enthielt, die nach unseren Versuchen durch Bakterien abgebaut werden unter Bildung von verhältnismäßig sehr viel flüchtiger Säure, ohne daß dabei Mannit entsteht. Da der betreffende Birnwein bei ca. 15° lagerte und am 28. November noch 11⁰/₁₀₀ Zucker enthielt, hätte vielleicht eine Mannitgärung noch nachträglich eintreten können, allein die unbedeutende Zunahme an flüchtiger Säure bis zum 14. März zeigt, daß dies nicht der Fall war.

Hier mag das Beispiel eines deutlich milchsäurestichig riechenden und schmeckenden Apfelweines (aus Zitronenäpfeln) angeführt werden, der vom Produzenten eingeschickt wurde. Der betreffende Apfelwein enthielt 6,32⁰/₁₀₀ flüchtige Säure (als Essigsäure); 5,04⁰/₁₀₀ Milchsäure und 3,05⁰/₁₀₀ Mannit. In der Flasche entwickelte der Wein noch lebhaft Kohlensäure und zeigte ein starkes Depot von gleichartig beschaffenen Bakterien in Form von Stäbchen, die nach der Dicke zu urteilen, zu *Bacterium mannitopœum* gehörten. Eine Reinkultur dieser Stäbchen ergab das im 3. Kapitel beschriebene *Bacterium mannitopœum* p. Alle Umstände deuten darauf hin, daß wir es hier mit dem Milchsäurestich, verbunden mit Mannitgärung, zu tun haben: Der hohe Gehalt an Essigsäure neben viel Milchsäure, der Mannitgehalt, Geruch und Geschmack des Getränkes und endlich auch die Art der Bakterien. Bei dem etwas zu hoch erscheinenden Essigsäuregehalt ist zu berücksichtigen, daß solche Getränke oft nicht mit der nötigen Sorgfalt behandelt werden, so daß zu dem Milchsäurestich noch etwas Essigstich hinzutreten kann. Welcher hoher Milchsäuregehalt infolge von Milchsäurestich erreicht wird, möge folgendes Beispiel zeigen.

Ein aus kernteigen Theilersbirnen hergestellter Saft wurde bei ca. 17° der spontanen Gärung in Gärflaschen überlassen. Nach Abschluß derselben enthielt der Wein pro Liter:

8,24 g Gesamtsäure (als Äpfelsäure)
 3,49 g flüchtige Säure (als Essigsäure)
 4,40 g nicht flüchtige Säure (als Äpfelsäure)
 8,10 g Milchsäure
 4,74 g Zucker (als Invertzucker)
 55,91 g Alkohol und
 61,5 g Extrakt.

Der ziemlich hohe Gehalt an flüchtiger Säure neben der Milchsäure zeigt, daß hier ein typischer Fall von Milchsäurestich vorliegt.

In den vorstehend mitgeteilten und zahlreichen anderen beobachteten Fällen wurde als Ursache des Milchsäurestiches das *Bacterium mannitopœum* erkannt. Doch kann gelegentlich, wenn auch selten, das *Bacterium gracile* die gleichen Erscheinungen herbeiführen, wie nachfolgendes Beispiel zeigen mag.

Ein bei 17° in Gärflaschen der spontanen Gärung überlassener Theilersbirnwein war nach der Gärung folgendermaßen beschaffen:

7,27⁰/₁₀₀ Gesamtsäure (als Äpfelsäure)
 4,04⁰/₁₀₀ flüchtige Säure (als Essigsäure)
 2,83⁰/₁₀₀ nicht flüchtige Säure (als Äpfelsäure)
 5,94⁰/₁₀₀ Milchsäure
 6,17⁰/₁₀₀ Zucker (als Invertzucker)
 42,06⁰/₁₀₀ Alkohol (Gewichts-%)
 58,6⁰/₁₀₀ Extrakt.

Die im Depot befindlichen Bakterien erwiesen sich als zarte kurz gegliederte Fäden und sehr viel feine diplokokkenartige Kurzstäbchen von ca. $0,6\ \mu$ Dicke. Da nach den Versuchen in Hefeauszug mit Zucker *Bacterium gracile* den letzteren unter Bildung von Milchsäure und viel flüchtiger Säure zerlegen kann, so dürfen wir wohl das hier tätige Bacterium zu *Bacterium gracile* rechnen.

Mit dem in diesem Weine eingetretenen Milchsäurestich war auch eine Mannitgärung verbunden, was aus der geringen Menge Alkohol im Verhältnis zum verschwundenen Zucker hervorgeht. Der Zuckergehalt hatte abgenommen um $104,6\text{‰}$; dem entstandenen Alkohol entsprechen aber nur $87,6\text{‰}$. Es sind also ca. 17‰ Zucker in anderer Weise und zwar vorwiegend zur Mannitbildung verwendet worden, worauf auch der hohe Extraktgehalt hinweist.

Da in Traubenweinen unserer Gegend der Milchsäurestich infolge des hohen Säuregehaltes seltener auftritt, so wurden die frisch abgepreßten Säfte einiger Traubensorten zuerst mit kohlensaurem Kalk teilweise entsäuert und dann bei 17° der spontanen Gärung überlassen. Von diesen Weinen möge ein Beispiel hier näher erörtert werden.

Der Saft von Malinger Trauben enthielt unvergoren $8,27\text{‰}$ Gesamtsäure (als Äpfelsäure berechnet). Durch reinen kohlensauren Kalk wurde dann der Säuregehalt auf $3,29\text{‰}$ herabgesetzt und dieser teilweise entsäuerte Wein zeigte nach der Gärung folgende Zusammensetzung:

$8,77\text{‰}$	Gesamtsäure (als Äpfelsäure)
$4,27\text{‰}$	flüchtige Säure (als Essigsäure)
$4,07\text{‰}$	nicht flüchtige Säure (als Äpfelsäure)
$63,93\text{‰}$	Alkohol
$20,6\text{‰}$	Mannit
$50,3\text{‰}$	Extrakt.

Auf den ersten Blick könnte die starke Vermehrung der Gesamtsäure überraschen, allein man erkennt bald, daß diese Säurevermehrung die Folge eines ausgeprägten Milchsäurestiches ist, bei dem viel flüchtige Säure und Milchsäure entstanden. Die 4‰ Essigsäure sind wirklich durch Milchsäurebakterien gebildet worden und nicht etwa durch Essigbakterien, denn die Gärgefäße waren mit Gärverschlüssen versehen. Es handelte sich also hier, wie überhaupt beim Milchsäurestich, um eine anaerobe Essigsäurebildung im Gegensatz zu der aeroben durch Essigbakterien. Die 4‰ nicht flüchtige Säure sind aller Wahrscheinlichkeit nach etwas Bernsteinsäure und Weinsäure oder deren saure Salze und zum Teil auch Milchsäure, während die ursprünglich vorhandene Äpfelsäure abgebaut wurde. Da die Weine vollständig vergoren waren, so erscheint der hohe Extraktgehalt etwas auffällig; allein er wird erklärt durch die 20‰ Mannit. Es war also auch hier der Milchsäurestich von Mannitgärung begleitet.

Daß in einem Wein das Auftreten des Milchsäurestiches, wie eben nachgewiesen, wesentlich vom ursprünglichen Säuregehalt abhängt, zeigt auch folgender Versuch mit Birnwein aus gesunden und aus teigen Birnen desselben Baumes. Der erstere besaß in unvergorenem Zustand nur $1,5\text{‰}$ mehr Säure als der letztere. Dennoch war das Verhalten der bei 13° befindlichen Birnweine hinsichtlich des Milchsäurestiches ein ganz verschiedenes, wie aus Tabelle 79 zu ersehen ist.

Das den Milchsäurestich gewöhnlich verursachende *Bacterium mannitopæum* verträgt keine hohen Säuregrade; $4,8\text{‰}$ Äpfelsäure

würde aber doch nicht seine Entwicklung und Tätigkeit zu verhindern vermögen (siehe Tabelle 12, p. 184). In Obstweinen wird aber der hemmende Einfluß der Säure öfters noch durch Gerbstoff unterstützt und es genügt dann ein geringerer Säuregrad zur Verhinderung des Milchsäurestiches. Ein solcher Fall liegt auch hier vor, denn frische gesunde Theilersbirnen enthalten in der Regel noch Gerbstoff, während dieser beim Teigwerden rasch verschwindet.

Tabelle 79.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Saft aus nicht teigen Birnen, unvergoren	4,85	0,23	4,60	126,96	—	196,7
Wein aus nicht teigen Birnen, vergoren	6,70	0,12	6,57	1,33	62,84	42,0
Saft aus teigen Birnen, unvergoren	3,35	0,35	2,96	132,46	—	194,7
Wein aus teigen Birnen, vergoren	4,72	2,25	2,25	17,24	55,20	63,7

Bei dem Saft aus frischen, nicht teigen Birnen hat weder ein Säureabbau stattgefunden, noch ist Milchsäurestich, d. h. Milchsäurebildung aus Zucker, eingetreten, was daraus hervorgeht, daß keine flüchtige Säure gebildet wurde und die Untersuchung des Trubes neben Hefezellen nur ganz vereinzelte Bakterien erkennen ließ. Die Zunahme an Gesamtsäure ist der Hefetätigkeit zuzuschreiben.

Ganz anders verhielt sich der Wein aus teigen Birnen, der nach Geruch und Geschmack deutlich milchsäurestichig erschien. Die beträchtliche Zunahme an flüchtiger Säure ließ hier das Auftreten des Milchsäurestichs deutlich erkennen, denn Essigbildung durch Essigbakterien war durch den vollkommenen Luftabschluß ausgeschlossen. Die mikroskopische Untersuchung des Trubes bestätigte diese aus der chemischen Zusammensetzung gewonnene Schlußfolgerung. Neben den Hefezellen fanden sich Stäbchen und fadenförmige Bakterien, wohl zu *Bacterium mannitolopæum* gehörig. Befremdlich erscheint, daß in diesem Falle der Milchsäurestich nicht von Mannitgärung begleitet war, was sich durch Berechnung aus den Zucker- und Alkoholgehalten feststellen läßt. Den 55,20‰ Alkohol entsprechen ca. 115‰ Zucker (100 Zucker = ca. 48 Alkohol). Zu diesem Zucker kommen noch 17‰ unvergorener Zucker hinzu, zusammen also 132‰. So groß war nun auch der Zuckergehalt des Obstsaftes, so daß unmöglich erhebliche Mengen Mannit gebildet worden sein konnten. Irgendwelche, uns zurzeit nicht bekannte, vielleicht in der Beschaffenheit des Obstweines liegende Umstände mögen hier die Mannitbildung verhindert haben.

Daß ein höherer Säuregehalt die Weine und Obstweine vor Milchsäurestich zu schützen vermag, geht aus einer ganzen Reihe von Beobachtungen hervor; es möge genügen, hier noch einige Beispiele anzuführen. So wurde z. B. ein Fischbächler Birnwein aus gut ausgereiften, also nicht mehr gerbstoffreichen Birnen am 29. September der spontanen Gärung in einem Raume überlassen, dessen Temperatur von 14,8 allmählich auf 11° sank. Die Weine vergoren hier gut und blieben bis zum August des folgenden Jahres

auf dem Trub liegen, während welcher Zeit die Temperatur allmählich auf 16° stieg. Die von Zeit zu Zeit vorgenommene Untersuchung ergab folgendes Resultat:

Tabelle 80.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Zucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Fischbäblersaft, unvergoren . . .	7,70	0,16	7,52	0,56	85,3	—	126,5
Fischbäblerwein, 21. Januar . .	7,77	0,37	7,36	0,70	0,64	42,8	32,7
„ 29. März . . .	7,57	0,40	7,13	—	0,63	43,6	32,5
„ 7. Juni . . .	7,80	0,49	7,26	0,66	0,60	42,4	32,0
„ 16. August . .	7,80	0,38	7,38	0,61	0,19	42,3	32,3

Nach der Gärung haben sich die Weine trotz der Lagerung auf dem Trub nicht weiter verändert. Sowohl der Gehalt an flüchtiger Säure als auch der an Milchsäure blieben unverändert. Es ist also weder Säureabbau noch Milchsäurestich eingetreten, wohl infolge des Einflusses der Säure, der allerdings anfangs durch die nicht hohe Temperatur unterstützt wurde. Mit diesem Befund steht die Beschaffenheit des Trubes in Übereinstimmung, indem sich neben den Hefen keine Bakterien vorfanden.

Daß Obstweine mit noch höheren Säuregehalten nicht milchsäurestichig werden, ist nun leicht verständlich. So blieb z. B. der Apfelwein vom „Dohuber Wildling“ mit 8,98‰ anfänglichem Säuregehalt (Äpfelsäure), der bei Zimmertemperatur vergor und längere Zeit lagerte, vom Milchsäurestich verschont und ebenso ein Apfelwein aus Weinäpfeln mit 12,9‰ ursprünglichem Säuregehalt (als Äpfelsäure). In beiden trat aber schließlich ein normaler Säureabbau durch *Bacterium gracile* ein, das bekanntlich höhere Säuregrade erträgt, als das den Milchsäurestich gewöhnlich verursachende *Bacterium manniotopœum*. Die Annahme, der Milchsäurestich sei ausgeblieben, weil keine Bakterien letzterer Art in den Saft gelangt wären, dürfte kaum aufrecht zu halten sein, denn stets, wenn die Beschaffenheit der Weine günstig ist, sehen wir die genannten Bakterien sicher auftreten.

Unsere säurereichen Traubenweine sind durch den hohen Säuregehalt in der Regel gegen den Milchsäurestich geschützt. Man kann sie aber für diesen empfänglich machen, indem man die Säure zum Teil neutralisiert. Das zeigt z. B. das Verhalten des schon erwähnten Malinger Weines (p. 308).

Der ursprüngliche Traubensaft enthielt 8,27‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure; der entsäuerte Traubensaft enthielt 3,29‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure).

Die spontan vergorenen Weine zeigten folgende Zusammensetzung:

	Gesamt- säure (Äpfel- säure)	Flüchtige Säure (Essig- säure)	Nicht flüchtige Säure (Äpfel- säure)	Alkohol	Mannit	Extrakt
Nicht entsäuert	6,70‰	0,22‰	6,46‰	82,45‰	—	24,6‰
Entsäuert . .	8,77‰	4,27‰	4,07‰	63,93‰	20,66‰	50,3‰

Bei dem nicht entsäuerten Wein hat zwar eine Abnahme der Gesamtsäure stattgefunden, aber diese ist, unter Berücksichtigung der geringen Menge flüchtiger Säure, auf einen reinen Säureabbau zurückzuführen. Anders verhielt sich der entsäuerte; hier ist entschieden Milchsäurestich, verbunden mit Mannitgärung eingetreten, was aus dem hohen Gehalt ($4,27^0/_{00}$) an flüchtiger Säure und sodann auch aus der erheblichen Menge ($20,66^0/_{00}$) von Mannit hervorgeht. Auf die Bildung dieser Substanz ist auch der Unterschied im Alkoholgehalt der beiden Weine zurückzuführen.

Noch deutlicher zeigt sich die Beziehung zwischen Säuregehalt und dem Milchsäurestich z. B. im folgenden Versuche mit einem Gutedelsaft, der vor der Gärung durch Zusatz von reinem kohlensaurem Kalk in verschiedenem Grade entsäuert wurde und den man vom 19. November an bei 25^0 der spontanen Gärung überließ. Die am 27. Januar vorgenommene Untersuchung ergab folgendes:

Tabelle 81.

	Gesamtsäuregehalt vor der Gärung (Apfelsäure) g im l	Nach der Gärung					
		Gesamtsäure als Apfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Apfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamtzucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l
Gutedelsaft, unvergoren	12,61	12,61	0,04	12,57	—	144,64	—
Gutedelwein, nicht entsäuert . .	12,61	9,11	0,38	8,69	3,15	0,0	67,5
„ um $\frac{1}{5}$ entsäuert . .	10,09 ¹⁾	6,42	0,51	5,86	—	—	—
„ um $\frac{2}{5}$ entsäuert . .	7,57 ¹⁾	3,97	0,63	3,28	—	—	—
„ um $\frac{3}{5}$ entsäuert . .	5,05 ¹⁾	2,80	1,49	1,16	3,65	0,0	67,2
„ um $\frac{4}{5}$ entsäuert . .	2,53 ¹⁾	13,48	7,00	5,78	5,06	0,0	55,1
„ um $\frac{9}{10}$ entsäuert . .	1,27 ¹⁾	10,70	5,10	5,09	5,26	0,0	52,3

Bei den höheren Säuregehalten zeigte sich trotz der hohen Temperatur kein Milchsäurestich, wie aus der geringen Zunahme an flüchtiger Säure geschlossen werden kann. Die Weine waren vollständig vergoren, haben aber einen entschiedenen Säureabbau erlitten.

Erst bei dem um $\frac{3}{5}$ entsäuerten Wein, der ursprünglich noch $5,05^0/_{00}$ Gesamtsäure enthielt, machte sich nun auch ein schwacher Milchsäurestich bemerkbar, wie aus dem Gehalt an flüchtiger Säure zu erkennen ist. Daß aber hier andererseits nicht viel Zucker von den Bakterien abgebaut wurde, erkennt man deutlich aus dem Alkoholgehalt, der dem des nicht entsäuerten Weines fast gleichkommt. Die Milchsäure rührt demgemäß nur zu einem kleineren Teil von Milchsäurestich, hingegen zum größeren Teil vom Säureabbau her. Ganz entschieden tritt aber der Milchsäurestich bei dem um $\frac{4}{5}$ entsäuerten Weine hervor, was die großen Mengen Milchsäure und flüchtiger Säure beweisen. Aus dem geringen Gehalt an Alkohol läßt sich auch eine erhebliche Mannitbildung ableiten, denn, trotzdem aller Zucker verschwunden war, fanden sich nur 55 statt $67^0/_{00}$ Alkohol. Wenn trotz des hohen Gehaltes an flüchtiger Säure der Zucker doch zum größten Teil umgesetzt wurde, so darf dies nicht befremden; die alkoholische Gärung verlief außerordentlich rasch und war nach 6 Tagen nahezu vollendet, während die Bakterien in dieser Zeit

¹⁾ Diese Säuregehalte sind aus dem ursprünglichen nach der Menge des zugesetzten Calciumkarbonats berechnet.

trotz günstiger Verhältnisse sich nicht so schnell zu entwickeln vermochten. Sie haben dann hauptsächlich den zuletzt noch vorhandenen Zucker abgebaut; die dabei entstehende Essigsäure konnte aber keinen hemmenden Einfluß mehr auf die Hauptgärung ausüben. Ganz ähnlich war der Verlauf bei dem um $\frac{9}{10}$ entsäuerten Wein. Die Untersuchung des Hefetrubs dieser Weine lieferte eine schöne Bestätigung der bisherigen Darlegungen. In den säurereichen Weinen, wo nur Säureabbau eintrat, fanden sich neben den Hefezellen die zarten Stäbchen und Fäden von *Bacterium gracile*, bei den beiden stärkst entsäuerten, die einen ausgeprägten Milchsäurestich zeigten, dagegen solche von *Bacterium mannitolopœum*.

Wie sehr die Temperatur das Auftreten des Milchsäurestiches beeinflusst, zeigte schon ein Parallelversuch zu dem vorhin beschriebenen, bei dem sich die Versuchsflaschen während der Gärung und weiteren Lagerung in einem Raum von 12° befanden. Hier hat in allen Versuchsweinen ein Säureabbau stattgefunden, in keinem aber, selbst in dem stärkst entsäuerten nicht, trat in der gleichen Zeit Milchsäurestich ein. So betrug bei dem um $\frac{4}{5}$ entsäuerten Wein die Gesamtsäure 1,39°/∞ (Äpfelsäure), die flüchtige Säure 0,27, bei dem um $\frac{9}{10}$ entsäuerten 0,82°/∞ bzw. 0,55°/∞.

Um den Einfluß der Temperatur auf das Zustandekommen des Milchsäurestiches noch genauer zu prüfen, wurde am 30. September ein Versuch mit mildem Obstsaft von Theilersbirnen eingeleitet, bei dem die mit Gärverschlüssen versehenen Flaschen in die verschiedenen warmen Fächer eines großen Panum'schen Thermostaten zu stehen kamen. Hier blieben sie bis zur Zeit der Untersuchung (6.—15. Februar). Die Temperaturangaben sowie die Ergebnisse der Analysen finden sich in folgender Tabelle.

Tabelle 82.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure	Flüchtige Säure als Essigsäure	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure	Milchsäure	Gesamt- zucker als Invertzucker	Alkohol	Extrakt
	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l	g im l
Theilersbirnsaft, unvergoren . . .	3,03	0,31	2,69	—	132,4	—	—
Theilersbirnwein, vergoren bei 33-35°	7,62	2,86	4,47	4,05	5,9	55,3	53,1
„ „ „ 25-27°	8,74	3,30	5,11	4,50	0,9	56,9	48,9
„ „ „ 20-22°	8,54	3,12	5,11	4,21	1,2	61,3	39,6
„ „ „ 17-19°	8,44	3,21	4,91	4,10	0,4	63,7	—
„ „ „ 14-16°	7,50	2,97	4,23	4,61	2,3	61,3	40,6
„ „ „ 11-13°	6,70	2,37	4,09	4,44	1,9	63,5	39,3
„ „ „ 8-10°	4,48	1,51	2,82	3,20	2,9	64,4	36,9
„ „ „ 5-7°	3,78	0,39	3,35	1,91	8,0	63,3	42,6

Es dürfte genügen, die Weine bei der höchsten und niedersten Temperatur miteinander zu vergleichen. Bei 5—7° ist Milchsäurestich nicht eingetreten. Das zeigt der niedere Gehalt an flüchtiger Säure. Die hier entstandene Milchsäure ist größtenteils auf einen Abbau der Äpfelsäure zurückzuführen. Dazu wird noch etwas Milchsäure aus Zucker gekommen sein. Doch fand diese Zuckerzersetzung nicht in dem Maße statt, daß ein eigentlicher Milchsäurestich zustande kam. Ganz anders war das Verhalten bei 33—35°. Auch hier hat ein Säureabbau stattgefunden. Daneben ist aber auch der Milchsäurestich stark aufgetreten, was aus dem hohen Gehalt an flüchtiger Säure und

Milchsäure hervorgeht. Mit dem Milchsäurestich war dann auch noch Mannitgärung verbunden, wie der direkte Nachweis des Mannits erkennen ließ, was aber ebenso aus den gefundenen Mengen von Zucker, Alkohol und Extrakt hervorgeht. Während bei 5—7° 63,3 g Alkohol sich fanden und daneben noch 8 g unvergorener Zucker, wurden bei 33—35° nur 55,3 g Alkohol gebildet, obgleich weniger Zucker unvergoren blieb. Der zuckerfreie Extrakt beträgt bei der niederen Temperatur 34,6 g, bei der hohen 47,2 g, also 12,6 g mehr. Wird auch für den Mehrgehalt an Milchsäure etwa 2 g abgezogen, so kann doch auf eine Mannitbildung von ca. 10 g geschlossen werden. Die bei den übrigen Temperaturen vergorenen Weine zeigen Übergänge zwischen diesen beiden Extremen. Bei allen trat neben Säureabbau deutlicher Milchsäurestich ein, wobei auffallenderweise nur noch bei 25—27° eine erheblichere Mannitbildung durch Rechnung festzustellen ist, während bei den weniger hohen Temperaturen Milchsäurestich nicht mehr mit Mannitbildung verbunden war. In den Truben fanden sich zahlreiche Stäbchen und lange Fäden vom Typus des *Bacterium mannitopæum*. Nur im Trub der Weine bei 5—7° waren sie bloß vereinzelt vorhanden.

Nachdem die Versuche ergeben hatten, daß säurereiche Weine vor dem Milchsäurestich geschützt sind, lag es nahe, diesen Schutz bei säurearmen Weinen durch Zusatz von Säure künstlich herbeizuführen. Bei einem diesbezüglichen Versuche (Müller-Thurgau und Osterwaller 1; p. 259) ging man von einem Saft aus vollreifen (also säurearmen) Theilersbirnen aus und verwendete als Zusatz Äpfelsäure und Weinsäure, wenn auch erstere als direkter Zusatz praktisch nicht in Betracht kommt.

Bei dem Versuche mit Äpfelsäure wurden dem unvergorenen Birnsafte 3, 4, 5 und 10 g Äpfelsäure pro Liter zugefügt. (In Wirklichkeit wurde der Säuregehalt, auf Äpfelsäure berechnet, durch 10 g Äpfelsäure nur um 8,98‰ erhöht.) Die Versuchsweine wurden der spontanen Gärung überlassen und standen in einem Raum von 12—14°; von Ende Dezember an befanden sie sich bei 14—16°. Nachfolgende Tabelle zeigt nun das Verhalten der Säure bei der Gärung und weiteren Lagerung.

Tabelle 83.

	Vor der Gärung, am 15. September			nach der Gärung, am 21. Dezember			am 23. August		
	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüchtige Säure als Äpfelsäure g im l	Gesamtsäure g im l	Flüchtige Säure g im l	Nicht flüchtige Säure g im l	Gesamtsäure g im l	Flüchtige Säure g im l	Nicht flüchtige Säure g im l
Ohne Säurezusatz	4,15	0,36	3,75	4,35	0,51	3,79	6,96	2,90	3,77
Mit ca. 3‰ Äpfelsäurezusatz . . .	6,84	0,36	6,44	—	—	—	7,23	2,88	4,06
Mit ca. 4‰ Äpfelsäurezusatz . . .	7,74	0,36	7,34	—	—	—	6,63	2,40	3,99
Mit ca. 5‰ Äpfelsäurezusatz . . .	8,50	0,36	8,10	9,11	0,39	8,68	5,66	0,84	4,74
Mit ca. 10‰ Äpfelsäurezusatz . . .	13,13	0,36	12,73	13,19	0,34	12,82	7,50	0,87	6,54

Während der Gärung und bis zum 21. Dezember hat bei sämtlichen Versuchsbirnweinen eine Änderung im Säuregehalt nicht stattgefunden. Im weiteren Verlauf trat aber deutlicher Milchsäurestich auf und zwar nicht nur bei dem Birnwein ohne Säurezusatz, sondern auch bei jenen, denen 3⁰/₁₀₀ und 4⁰/₁₀₀ Äpfelsäure zugefügt worden waren. Dagegen hatte der Zusatz von 5⁰/₁₀₀ und 10⁰/₁₀₀ vermocht, um den Birnwein auch bei verhältnismäßig warmer Lagerung gegen Milchsäurestich zu schützen, wie aus der geringeren Zunahme an flüchtiger Säure zu ersehen ist.

Während die Säurezusätze von 5⁰/₁₀₀ und 10⁰/₁₀₀ genügten, den Milchsäurestich zu verhindern, wurde in diesen Weinen doch die Säure abgebaut. Es haben also die Bakterien, die diesen Vorgang vollziehen, sich widerstandsfähiger erwiesen, als die den Milchsäurestich verursachenden, was mit dem von uns näher festgestellten Verhalten von *Bacterium gracile* und *Bacterium manniopœum* gegenüber hohen Säuregehalten übereinstimmt. Auch in den übrigen Weinen hat offenbar ein Säureabbau stattgefunden, allein hier ist zudem Milchsäurestich eingetreten.

Bei einem weiteren Versuche, bei dem nicht nur Äpfelsäure, sondern zum Vergleich auch Weinsäure als Zusatz benützt wurde, erwies sich diese den Milchsäurestich verursachenden Bakterien gegenüber etwas wirksamer als die Äpfelsäure. Besonders kam aber die schützende Wirkung der Säuren zur Geltung, wenn gleichzeitig Reinhefe verwendet wurde.

Tabelle 84.

	Vor der Gärung, (21. September)			Gärung durch Eigenhefe (10. Februar)			Gärung durch Eigenhefe + Rein- hefe (10. II.)		
	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Gesamtsäure g im l	Flüchtige Säure g im l	Nicht flüch- tige Säure g im l	Gesamtsäure g im l	Flüchtige Säure g im l	Nicht flüch- tige Säure g im l
Ohne Säurezusatz	3,2	0,47	2,68	8,88	3,28	5,27	6,63	2,16	4,25
Mit ca. 1 ⁰ / ₁₀₀ Wein- säure	4,04	0,47	3,52	8,08	2,56	5,26	6,37	1,22	5,03
Mit ca. 2 ⁰ / ₁₀₀ Wein- säure	4,82	0,47	4,30	7,87	1,78	5,91	6,79	0,86	5,84
Mit ca. 3 ⁰ / ₁₀₀ Wein- säure	5,66	0,47	5,14	7,67	1,61	5,90	6,83	0,72	6,04
Mit ca. 1 ⁰ / ₁₀₀ Äpfel- säure	4,1	0,47	3,58	7,99	2,66	5,06	6,13	1,44	4,55
Mit ca. 2 ⁰ / ₁₀₀ Äpfel- säure	5,08	0,47	4,56	7,17	2,07	4,89	6,53	1,55	4,83
Mit ca. 3 ⁰ / ₁₀₀ Äpfel- säure	6,02	0,47	5,50	7,25	1,98	5,07	6,37	0,86	5,42

Schon bei dem Obstwein ohne Säurezusatz läßt sich der günstige Einfluß der Reinhefe deutlich erkennen, indem erheblich weniger flüchtige Säure gebildet wurde. Er tritt noch deutlicher hervor, wo der Zusatz von Säure mitwirkte; so genügte schon ein solcher von 1⁰/₁₀₀, um vereint mit dem Hefeinfluß den Milchsäurestich ganz wesentlich hintanzuhalten. Dieser hier

beobachtete günstige Einfluß einer vor der Gärung zugesetzten Reinhefe läßt sich auf 2 Umstände zurückführen. Einmal ist der Vorgang der Alkoholgärung durch die Reinhefe beschleunigt und der Zucker dabei vollständiger vergoren worden, wie aus dem Gärverlauf hervorgeht, und daraus, daß z. B. in dem Wein ohne Säurezusatz bei spontaner Vergärung 67,4, bei Vergärung mit Anwendung von Reinhefe 72,0⁰/₁₀₀ Alkohol entstanden. Infolgedessen hatten die Bakterien weniger Zeit und Gelegenheit sich zu entwickeln und größere Mengen von Zucker umzusetzen. In zweiter Linie kommt die ausgesprochene Fähigkeit der angewendeten Hefe Wädenswil 4, bei der Gärung den Gehalt an nicht flüchtiger Säure zu erhöhen, in Betracht, wodurch auch auf diese Weise der Entwicklung der Bakterien entgegengewirkt wird.

Gestützt auf diese Versuchsergebnisse liegt es nahe, den Milchsäurestich der Getränke dadurch zu verhindern, daß man ihnen von Anfang an einen genügenden Säuregehalt verleiht, was nur möglich ist durch rechtzeitige Ernte der Trauben und Obstfrüchte, bei letzteren außerdem durch Mischen von Früchten verschiedenen Säuregehaltes. Wo diese Mittel aber aus praktischen Gründen nicht anwendbar sind oder nicht wünschenswert erscheinen, da ließe sich an einen künstlichen Zusatz von Säure denken und es wäre dann die Frage zu erörtern, welche Säure sich hierzu am besten eignete. Die leicht abbaubare Äpfelsäure käme schon aus diesem Grunde, namentlich aber, wie schon erwähnt, auch des hohen Preises wegen nicht in Betracht. Zitronensäure wäre in gewissem Sinne noch weniger geeignet als Äpfelsäure, weil sie ebenfalls leicht abgebaut und dabei zudem viel flüchtige Säure gebildet wird. Der Zusatz von Milchsäure sollte auf alle Fälle untersagt werden, um, wie wir im folgenden Abschnitt zeigen werden, der Weinkontrolle nicht unübersteigliche Hindernisse zu bereiten; so bleibt nur die Weinsäure übrig, deren Anwendung z. B. in Frankreich bei Traubensäften mit zu geringem Säuregehalt schon gestattet ist, bei uns für Traubensäfte allerdings weniger erforderlich wäre, wohl aber für gewisse säurearme Obstweine.

Nicht nur der Säureabbau kann, wie wir schon früher erwähnten, durch hohen Gerbstoffgehalt verhindert werden, sondern auch der Milchsäurestich, wie z. B. aus folgendem Versuch deutlich hervorgeht.

Ein Reinholzbirnsaft, der vor der Gärung 5,25 g Gerbstoff pro Liter (bestimmt nach der Methode Neubauer-Löwenthal) enthielt, wurde bei 15—16° in Flaschen der spontanen Gärung überlassen und nach derselben während des folgenden Sommers noch weiter beobachtet. Um auch noch den Einfluß des Hefetrubes festzustellen, blieb ein Teil dieser Obstweine während der ganzen Dauer auf der Hefe liegen, während andere teils früh, teils später von der Hefe abgezogen wurden. Doch soll hier nur das Verhalten der auf dem Hefetrub verbliebenen Weine berücksichtigt werden (bezüglich der anderen Beobachtungen sei auf die ausführliche Veröffentlichung von Müller-Thurgau und Osterwalder (5; III. Teil, p. 375) verwiesen. Die Gärung verlief glatt und war am 35. Tage (29. November) beendet. Die Zusammensetzung der Obstweine zu den verschiedenen Zeiten ist aus Tabelle 85 (folg. Seite) zu ersehen.

Der Umstand, daß die flüchtige Säure nur in geringer Menge vorhanden war und nach der Gärung überhaupt nicht mehr zunahm, beweist aufs deutlichste, daß in diesem Obstwein der Milchsäurestich nicht eintrat. Da der ursprüngliche Säuregehalt dessen Auftreten nicht verhindern konnte, und da außerdem die Temperaturverhältnisse sehr günstige waren, und zudem die Weine auf dem Trub liegen blieben, so müssen die Bakterien durch einen

kräftigen anderweitigen Einfluß zurückgehalten worden sein; wir sind wohl berechtigt, diesen dem hohen Gerbstoffgehalt zuzuschreiben. Der letztere wird auch die Ursache gewesen sein, daß in diesen Obstweinen der normale Säureabbau ebenfalls nicht stattfinden konnte. Es war dann nicht überraschend, daß bei der Untersuchung des Trubes dieser Obstweine neben den Alkoholhefen keine Bakterien gefunden wurden.

Tabelle 85.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Zucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Reinholzbirnsaft, unvergoren . . .	4,75	0,07	4,67	0,45	118,9	—	171,0
Reinholzbirnwein 29. November	4,72	0,27	4,42	1,12	1,7	52,4	44,1
„ 17. Januar . .	4,82	0,22	4,58	1,12	1,0	51,7	43,8
„ 3. Mai . . .	4,49	0,23	4,24	—	1,2	54,5	42,6
„ 1. September	4,65	0,18	4,45	0,67	1,0	53,7	—

Nachdem von anderer Seite des öfteren der günstige Einfluß des Hefetrubes auf die Entwicklung von Bakterien hervorgehoben wurde, suchten wir festzustellen, inwieweit durch frühzeitigen Abzug vom Hefetrub der Milchsäurestich zu verhindern oder doch zu hemmen ist (Müller-Thurgau und Osterwalder; 5). Aus diesen Untersuchungen mögen hier nur einige Angaben herausgegriffen werden. Im ganzen ließen die Versuche erkennen, daß, wenn die Verhältnisse für die Entwicklung des *Bacterium manniotopæum* günstig sind (niederer Gehalt an Säure und Gerbstoff, hohe Temperatur), selbst ein frühzeitiger Abzug von der Hefe die Weine nicht vor dem Milchsäurestich zu schützen vermag; denn gewöhnlich tritt er schon vor Abschluß der Gärung ein, bevor also ein Abzug von der Hefe durchführbar ist. Zieht man aber solche Weine schon vor dem Abschluß der Gärung ab, so vermehren sich die Bakterien im abgezogenen Weine erst recht weiter und zersetzen den noch vorhandenen Zucker unter Bildung von Essigsäure, Milchsäure und Mannit. Sind die Verhältnisse für den Milchsäurestich etwas ungünstiger, z. B. bei niedriger Gärtemperatur, dann nimmt er im Verhältnis zur Alkoholgärung nicht so rasch überhand, so daß die Weine beim Abzug nach der Gärung noch nicht verdorben erscheinen. Hier kann ein frühzeitiges Abziehen den weiteren Fortschritt des Milchsäurestiches oft erheblich zurückhalten, wenn auch gewöhnlich nicht ganz verhindern.

Als Beleg für diese Ausführungen möge ein Versuch (Müller-Thurgau und Osterwalder 5; I. Teil. p. 729) dienen.

Ein Birnsaft aus gut ausgereiften Theilersbirnen wurde in Gärfaschen abgefüllt, der spontanen Gärung überlassen und zwar zum Teil bei 17—18°, zum Teil bei nur 14°. Von dem bei der höheren Temperatur vergorenen Wein füllte man einen Teil nach Abschluß der Gärung am 30. Oktober in Flaschen ab durch Abzug von der Hefe, während ein anderer Teil in den Flaschen auf dem Hefetrub verblieb. Das Verhalten der Weine mit und ohne Trub wurde von Zeit zu Zeit festgestellt; die Ergebnisse finden sich in Tabelle 86.

Tabelle 86.

Gärung bei 17—18°	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Theilersbirnsaft, unvergoren . . .	4,02	0,39	3,59	—	121,3	—	—
Theilersbirnwein, abgezogen, untersucht am 30. Oktober	4,65	1,44	3,07	3,21	1,58	60,3	34,1
„ 16. Dezember	4,45	1,72	2,56	4,83	2,45	58,4	34,7
„ 15. Januar	4,48	1,74	2,57	3,88	1,17	58,6	31,5
„ 9. April	5,12	2,02	2,90	5,40	1,06	58,6	—
Theilersbirnwein, nicht abgezogen, untersucht am 30. Oktober	4,65	1,44	3,07	3,21	1,58	60,3	34,1
„ 16. Dezember	7,53	2,70	4,56	5,40	0,30	60,6	33,0
„ 15. Januar	8,32	3,34	4,65	5,84	0,33	57,8	27,4
„ 8. März	8,94	4,12	4,41	4,69	0,29	58,8	27,1

Wie nicht anders zu erwarten war, zeigte sich der Birnwein schon beim Abzug, am 30. Oktober, milchsäurestichig. Durch den Abzug konnte das weitere Fortschreiten des Milchsäurestiches zwar nicht verhindert, aber doch gehemmt werden. Ein Handelsprodukt war aber weder der eine noch der andere Obstwein. Die nicht abgezogenen unterschieden sich von den abgezogenen weniger im Gehalt an Milchsäure als durch die Mengen flüchtiger Säure, deren Bildung beim Lagern auf dem Trub mehr gefördert wurde.

An dieser Stelle möge noch darauf hingewiesen sein, daß das den Milchsäurestich verursachende *Bacterium mannitolopæum*, dessen Haupttätigkeit in der Zersetzung des Zuckers unter Bildung von Essigsäure und Milchsäure besteht, auch dann noch weiter zu wachsen und die genannten Umsetzungsprodukte zu bilden vermag, wenn kein Zucker mehr vorhanden ist. Es greift dann Extraktstoffe anderer Art an, vielleicht Pentosen, Glycerin usw. Im vorliegenden Beispiel weist der niedere Extraktgehalt der nicht abgezogenen, am 15. Januar und 8. März untersuchten Weine auf einen solchen Vorgang hin. Hier war der Zucker schon vollständig abgebaut, der zuckerfreie Extrakt aber merklich niedriger als bei den übrigen Weinen.

In ganz gleicher Weise wurde mit demselben Birnsaft ein Versuch bei etwas niedriger Temperatur (bei 14°) durchgeführt; dessen Ergebnisse finden sich in Tabelle 87, p. 318.

Hier war der Birnwein zur Zeit des Abzuges noch ziemlich gesund, da er nur 0,68°/∞ flüchtige Säure enthielt. Die Milchsäure 2,20°/∞ stammt offenbar vom Säureabbau her und wohl nur in geringer Menge von einem beginnenden Milchsäurestich. Der Abzug vermochte aber die weitere Ausbildung des Milchsäurestiches nicht zu verhindern, wie die Zunahme der flüchtigen Säure erkennen läßt. Immerhin war diese in den nicht abgezogenen Weinen erheblich größer, so daß der frühzeitige Abzug bei 14° also doch die Steigerung des Milchsäurestiches erheblich gehemmt hat.

Um die Weine wärmerer Gegenden und die häufig säurearmen Obstweine gegen Milchsäurestich zu schützen, könnte man zur Anwendung schwefliger Säure schreiten, die entweder durch das übliche Einbrennen mit Schwefel oder auch durch Zusatz von Kaliummetasulfit dem Weine zugeführt wird. Da nun der Milchsäurestich gerade bei den empfind-

Tabelle 87.

Gärung bei 14°	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Theilersbirnsaft, unvergoren . . .	4,02	0,39	3,59	—	121,3	—	—
Theilersbirnwein, abgezogen							
untersucht am 30. Oktober	3,48	0,68	2,73	2,20	2,81	61,1	34,7
„ 15. Januar	3,49	1,59	1,74	3,26	2,84	57,9	32,0
„ 9. April	4,25	1,82	2,25	4,66	1,31	59,3	—
„ 5. Juli	4,55	1,89	2,47	5,00	1,30	—	33,8
Theilersbirnwein, nicht abgezogen,							
untersucht am 30. Oktober	3,48	0,68	2,73	2,20	2,81	61,1	34,7
„ 15. Januar	5,66	2,26	3,17	5,17	0,27	59,6	29,3
„ 9. April	5,56	2,31	3,02	4,95	0,45	59,0	28,6
„ 5. Juli	5,46	2,48	2,73	4,82	0,27	59,1	—

licheren Weinen oft schon während der Gärung eintritt, käme man mit dem Schutzmittel beim Abziehen der Weine häufig zu spät und nur da, wo durch weniger günstige Verhältnisse der Milchsäurestich etwas zurückgehalten wird, würde die Zufuhr schwefliger Säure beim Abzug der Weine noch von einigem Erfolg sein können. Auch diese Fragen haben wir in mehreren Arbeiten (Müller-Thurgau 4, p. 11 und Müller-Thurgau und Osterwalder, 6 p. 378) zu beantworten versucht, und es hat sich dabei ergeben, daß der Anwendung von schwefliger Säure als Schutzmittel gegen den Milchsäurestich nicht immer die Bedeutung, zukommt, die man ihr schon zugeschrieben hat. Andererseits kann der schwefligen Säure auch nicht jede schützende Wirkung abgesprochen werden. Es kommt dabei sehr auf die Beschaffenheit des Weines oder Obstweines an, dann natürlich auch auf die Menge der in den Wein gebrachten schwefligen Säure und ganz besonders auf den Zeitpunkt, zu welchem das Mittel angewendet wird. Zur Erläuterung der letzteren Beziehung möge ein Versuch hier erwähnt werden. (Die ausführliche Veröffentlichung der Ergebnisse erfolgt später.)

Ein Birnsaft aus gut ausgereiften, mild schmeckenden Reinholzbirnen wurde in Gärflaschen abgefüllt und bei 17° der spontanen Gärung überlassen. Ein Teil erhielt keinen Zusatz von Kaliummetasulfit, ein anderer Teil 225 Milligramm pro Liter und zwar bei einer Anzahl der Flaschen sofort, also schon vor der Gärung, bei anderen zur Zeit, da die Gärung etwa zur Hälfte beendet war, und bei weiteren erst nach Abschluß der Gärung. Die Obstweine verblieben auf dem Trub und wurden am 28. November, d. h. nachdem die Gärung vollendet war, und am 14. März untersucht. Am ersten Untersuchungstermin wurden jene Weine, die erst zu dieser Zeit den Sulfitzusatz erhalten haben, selbstverständlich nicht untersucht. Gleichzeitig führte man den nämlichen Versuch mit der doppelten Menge, nämlich 450 Milligramm, Kaliummetasulfit durch. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 88 zusammengestellt.

Während der Birnwein ohne Sulfitzusatz am 28. November schon vollständig verdorben, stark milchsäurestichig war, hat der Zusatz von 225 Milligramm Sulfite vor der Gärung den Milchsäurestich bedeutend zurückgehalten. Es wurden hier nur etwa 0,5‰ flüchtige Säure gebildet gegenüber 2,3 bei

dem ohne Sulfitzusatz gebliebenen. Der Birnwein war also zu dieser Zeit noch brauchbar und konnte durch Verschnitt mit einem säure- oder gerbstoffreichen Wein konsumfähig erhalten werden. Ohne solchen Zusatz ist aber, wie aus der Untersuchung am 14. März hervorgeht, der Milchsäurestich auch in diesem Weine aufgetreten.

Tabelle 88.

	Untersucht am 28. Nov.				Untersucht am 14. März			
	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamtsäure g im l	Flüchtige Säure g im l	Nicht flüch- tige Säure g im l	Milchsäure g im l
Reinholzbirnsaft, unvergoren	4,62	0,55	4,01	0,54	—	—	—	—
Reinholzbirnwein ohne Sulfid	4,96	2,87	1,80	5,10	5,96	3,25	2,38	6,08
Reinholzbirnwein mit 225 mg Sulfid, zugesetzt vor der Gärung	3,48	1,04	2,34	2,46	3,78	1,66	1,95	4,32
Reinholzbirnwein mit 225 mg Sulfid, zugesetzt während der Gärung	2,95	1,64	1,15	3,06	3,21	2,19	0,80	4,20
Reinholzbirnwein mit 225 mg Sulfid, zugesetzt nach der Gärung	—	—	—	—	4,85	2,89	1,67	5,16
Reinholzbirnwein mit 450 mg Sulfid, zugesetzt vor der Gärung	4,22	1,10	3,01	1,80	2,51	—	—	2,56
Reinholzbirnwein mit 450 mg Sulfid, zugesetzt während der Gärung	4,25	1,00	3,15	1,66	2,47	1,52	0,80	2,96
Reinholzbirnwein mit 450 mg Sulfid, zugesetzt nach der Gärung	—	—	—	—	5,29	3,39	1,56	5,54

Eine weniger günstige Wirkung hatte der erst während der Gärung erfolgte Zusatz von Kaliummetasulfid. Der so behandelte Wein war am 28. November schon deutlich, wenn auch nicht stark, milchsäurestichig. Immerhin war er bedeutend besser als der ohne Sulfid gebliebene. Auch in diesem Weine schritt der Milchsäurestich bei weiterem Lagern bis zum 14. März fort und hatte an diesem Tage einen etwas höheren Grad erreicht als bei dem anfangs mit Sulfid versetzten. Von den mit Sulfid versehenen Birnweinen war am 14. März derjenige am stärksten verdorben, bei dem der Zusatz erst nach der Gärung stattgefunden hatte. Hier kann von einem günstigen Erfolg kaum mehr die Rede sein.

Ein ähnliches Resultat ergab der Versuch mit der doppelten Menge schwefliger Säure. Nur war hier, wie zu erwarten stand, die Wirkung eine etwas weitergehende. Von den in den letzten 3 Zeilen der Tabelle dargestellten Ergebnissen verdienen folgende besondere Erwähnung. Der Erfolg des Sulfidzusatzes war hier derselbe, ob er vor oder während der Gärung stattfand, was erkennen läßt, daß der Milchsäurestich während der ersten Hälfte der Gärung sich noch nicht deutlich bemerkbar machte. Auch in diesen Weinen nahm jedoch nach der Gärung beim weiteren Lagern der Milch-

säurestich noch zu, wenn auch in geringerem Grade als bei den Weinen mit dem kleineren Sulfitzusatz. Die erst nach der Gärung zugefügte Menge von 450 Milligramm Kaliummetasulfit hatte gar keinen Erfolg, was verständlich ist, da die Birnweine zu dieser Zeit schon in hohem Grade milchsäurestichig waren. Ferner sei noch hervorgehoben, daß bei Anwesenheit von viel schwefliger Säure die Bildung von Milchsäure in stärkerem Maße zurückgehalten wurde als die von Essigsäure.

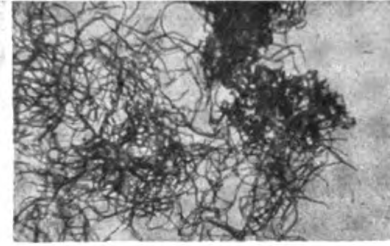
Schon in diesem Falle hätte man von den angewendeten Mengen schwefliger Säure einen weitergehenden Erfolg erwarten können, allein der größte Teil der schwefligen Säure wird, wie unsere Untersuchungen zeigten, in kurzer Zeit, oft schon nach wenigen Stunden, in die gebundene Form übergeführt und wirkt dann nicht mehr so hemmend auf die Entwicklung der Bakterien ein wie die freie schweflige Säure. Es hängt sehr von der Beschaffenheit der Säfte ab, ob diese Bindung der schwefligen Säure mehr oder weniger rasch und vollständig vor sich geht, und je nachdem wird auch der Erfolg des Einbrennens oder Zusatzes von schwefliger Säure verschieden sein. Im allgemeinen wird die schweflige Säure in Birnsäften rascher und vollständiger gebunden als in Apfel- und Traubensäften; daher läßt sich in letzteren beiden dem Milchsäurestich schon mit geringeren Mengen von schwefliger Säure vorbeugen als bei Birnsäften, wo oft selbst große Zusätze nur geringen Erfolg haben. So hat z. B. ein Theilersbirnsaft, dem man vor der Gärung 450 Milligramm Kaliummetasulfit pro Liter zufügte, einen Monat später, nach der Gärung, schon einen Gehalt von $1,47\%$ flüchtiger Säure und $4,38\%$ Milchsäure aufgewiesen; er war also schon stark milchsäurestichig.

Frühzeitig auftretender Milchsäurestich wirkt hemmend auf die Alkoholgärung ein. Die dabei entstehende flüchtige Säure ist ein Gift für die Weinhefe, und ihr Einfluß wird um so intensiver sein, in je größeren Konzentrationen sie vorhanden ist. Sie wird nicht nur eine Verzögerung der Gärung herbeiführen, sondern auch einen niedrigeren Vergärungsgrad, so daß in milchsäurestichigen Weinen je nach dem Zeitpunkt, wann der Milchsäurestich eintrat und nach seiner Stärke mehr oder weniger Zucker unvergoren bleibt. Der Milchsäure kommt wohl kaum ein gärungshemmender Einfluß zu oder doch nur, wenn sie in außerordentlich großen Mengen sich findet. Dagegen kann allerdings die mit dem Milchsäurestich meist verbundene Mannitgärung insofern einen Einfluß ausüben, als ein Teil des Zuckers der Alkoholgärung entzogen wird. Da die Mannitbildung nach unseren Beobachtungen namentlich bei hohen Temperaturen energisch stattfindet, so wird zwischen dem Grad des Milchsäurestiches und demjenigen der durch die gleichen Bakterien verursachten Mannitgärung nicht immer das gleiche Verhältnis bestehen. In einem Falle kann der Milchsäurestich vorherrschen, in einem anderen Falle die Mannitbildung, ersteres bei niedrigen, letzteres bei höheren Temperaturen. Milchsäurestich ohne Mannitbildung ist auch denkbar, wenn er erst auftritt nach fast vollständiger Vergärung des Zuckers, wo dann außer dem Zuckerrest noch andere Extraktstoffe, Pentosen, Glyzerin, Zitronensäure usw. zur gleichzeitigen Bildung von Milchsäure nebst viel flüchtiger Säure Veranlassung geben.

Auch hier mögen wieder einige Beispiele von Obstweinen, die uns ein so gutes und treffliches Material zum Studium des Milchsäurestiches der Weine bieten, Erwähnung finden. Ein Reinholzbirnsaft, dem man zum Teil Kaliummetasulfit (450 Milligramm pro Liter) zusetzte, zum Teil keinen



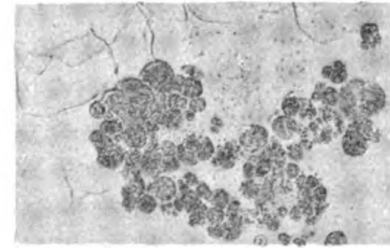
27 (1200)



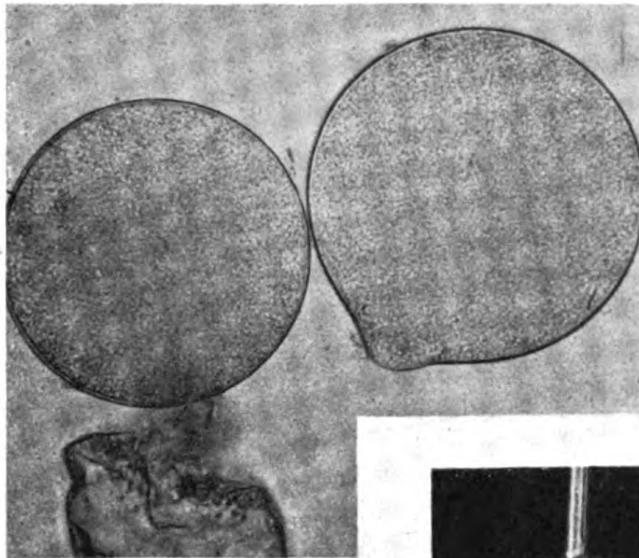
29 (150)



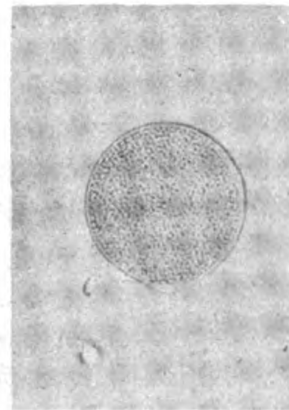
28 (1200)



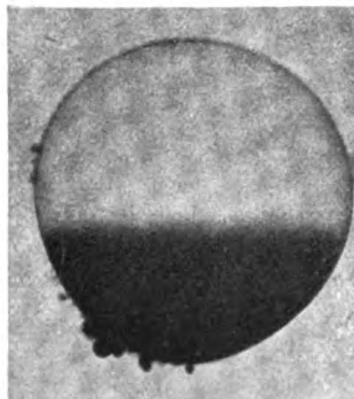
30 (350)



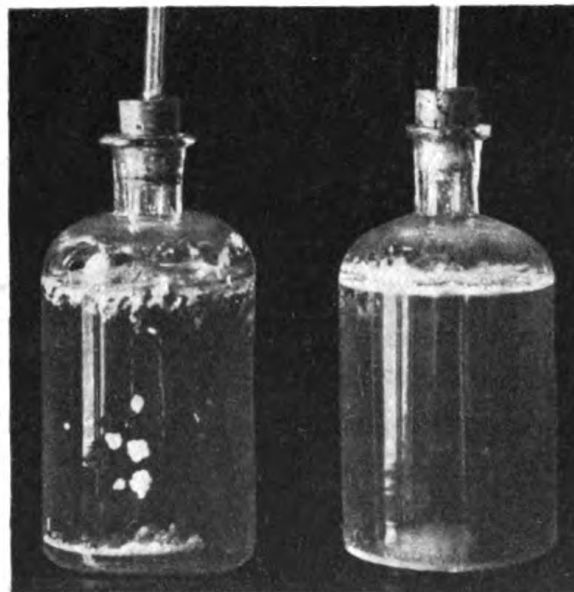
32 (300)



31 (400)



33 (30)



34 ($\frac{1}{3}$)

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

solchen Zusatz gab, wurde bei 16—17° der spontanen Gärung überlassen. Die Birnweine zeigten nach abgeschlossener Gärung, 4 Wochen nach Beginn des Versuches, folgende Zusammensetzung:

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Alkohol g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Extrakt g im l
Reinholzbirnsaft, unvergoren . . .	4,62	0,55	4,02	0,54	—	151,74	210,3
Reinholzbirnwein ohne Sulfit . . .	4,96	2,87	1,80	5,10	64,56	11,33	50,5
„ mit 450 mg Sulfit	4,22	1,10	3,01	1,80	72,81	2,90	43,4

Der Zusatz von schwefliger Säure hat zwar den Milchsäurestich nicht vollständig zu hindern vermocht, aber doch stark zurückgehalten, während der Obstwein ohne Zusatz einen ausgeprägten Milchsäurestich zeigte. Dem entsprechend wurde in letzterem Weine die Gärung vorzeitig unterbrochen, so daß noch 11⁰/₁₀₀ Zucker unvergoren blieben und 8,3⁰/₁₀₀ Alkohol weniger gebildet wurden. Wenn diese Minderausbeute an Alkohol nicht der Differenz an unvergorenem Zucker in den beiden Weinen entspricht, so zeigt dies nur, daß auch hier etwas Mannit entstand.

Während in diesem Beispiele der direkt hemmende Einfluß der beim Milchsäurestich entstehenden flüchtigen Säure auf die Alkoholgärung deutlich zutage tritt, läßt sich im folgenden Fall erkennen, wie die mit dem Milchsäurestich verbundene Mannitgärung die Menge des entstehenden Alkohols beeinträchtigen kann.

Ein Theilersbirnsaft wurde bei verschiedenen Temperaturen der spontanen Gärung überlassen. Dabei trat bei den höheren Wärmegraden Milchsäurestich ein, während dies bei der niederen Temperatur von 5—7° nicht der Fall war und die Alkoholgärung normal, wenn auch langsam, verlief. Nach 3 Monaten ergab die chemische Analyse folgende Zusammensetzung zweier dieser Weine.

	Gesamtsäure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l	Extrakt g im l
Birnwein bei 25—27° vergoren . .	8,74	3,30	5,11	4,50	0,9	56,9	48,9
„ „ 5—7° „ . .	3,78	0,39	3,35	1,91	8,0	63,3	42,6

In dem bei 5—7° vergorenen Wein fanden sich 63,3⁰/₁₀₀ Alkohol nebst infolge niederer Temperatur noch nicht vergorenen 8⁰/₁₀₀ Zucker. Würde dieser letztere auch noch vergoren worden sein, so hätten im ganzen ca. 67⁰/₁₀₀ Alkohol entstehen können. Der bei hoher Temperatur vergorene enthielt nun aber, trotzdem aller Zucker verschwunden war, nur 56,9⁰/₁₀₀ Alkohol, also etwa 10 g weniger, als bei normaler Alkoholgärung hätte gebildet werden können. Ein kleinerer Teil dieses Zuckers wurde verwendet zur Bildung von

Essigsäure und Milchsäure, also zur Erzeugung des Milchsäurestiches. Der größte Teil diente aber der Mannitgärung und wurde so der Alkoholgärung entzogen. Das Vorhandensein von Mannit ließ sich direkt nachweisen. Es läßt sich aber auch die Menge annähernd aus dem Extraktgehalt rechnerisch feststellen. Der zuckerfreie Extrakt beträgt bei dem kühl vergorenen 34,6 g, bei dem warm vergorenen 48 g. Berücksichtigt man, daß bei letzterem nahezu 2,6 g Milchsäure mehr vorhanden waren, so kommen auf den Mannitgehalt noch 10,8 g, ein Ergebnis, das mit dem aus den Alkoholgehalten berechneten ziemlich übereinstimmt.

Es ist selbstverständlich, daß genau die gleichen Vorgänge auch in säurearmen Traubenweinen stattfinden können. Schon Pasteur (1; p. 42) hat auf das Zusammenwirken der Milchsäurebakterien und Alkoholhefen während der Gärung hingewiesen. Er beobachtete bei der Herstellung eines Tresterweines, daß schon am 2. Tage neben der Alkoholgärung eine saure Gärung sich bemerkbar machte, daß neben den Hefezellen sich Fadenbakterien vorfanden, wobei er allerdings annahm, daß die Hefe eine gärschwache war und darum die Bakterien besser auftreten konnten. Der vergorene Tresterwein zeigte einen unangenehm hohen Säuregrad und war reich an flüchtiger Säure. Pasteur führt dann an, daß wenn auch dieses Zusammenwirken von Milchsäurebakterien mit Hefen in Weinen seltener auftrate, man diese Erscheinung doch im Auge behalten sollte.

Die Erscheinung des Milchsäurestiches, deren Merkmale wir im ersten Abschnitt (p. 13.) schilderten, wurde durch die Versuche mit den verschiedenen Zuckerarten und Säuren wesentlich aufgeklärt. In diesem Abschnitte sind nun Beispiele von Weinen und Obstweinen, die von selbst, ohne künstliche Infektion, milchsäurestichig wurden, zusammengestellt worden. In fast sämtlichen dieser Fälle war das *Bacterium mannitopæum* und nur ausnahmsweise das *Bacterium gracile* die Ursache der Krankheit. Als Haupterscheinung des Milchsäurestiches ist die Zersetzung von Zucker unter Bildung von Milchsäure und viel flüchtiger Säure zu betrachten. Damit ist in der Regel auch der Abbau der Äpfelsäure verbunden und meist auch eine Mannitgärung. Doch hängt die Menge des gebildeten Mannits wesentlich von der Temperatur ab und davon, wie weit die alkoholische Gärung beim Eintritt der Krankheit vorgeschritten war. Hoher Gehalt an Säure oder an Gerbstoff können jeder für sich den Milchsäurestich verhindern, mäßige Gehalte vermögen zusammenwirkend das gleiche zu erzielen. Ebenso kann sehr niedere Temperatur bei der Gärung als Schutzmittel wirken; doch genügen schon geringe Wärmegrade, um das Auftreten zu ermöglichen, wenn Säure- und Gerbstoffgehalt nicht hemmend mitwirken. Ein frühzeitiger Abzug vom Hefetrub kann ebenfalls als Schutzmittel gegen den Milchsäurestich betrachtet werden; doch gelangt dieses Mittel nicht zur Wirkung, wenn niederer Säure- und Gerbstoffgehalt und hohe Temperatur einen allzu günstigen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien ausüben. Wenn aber ein mittlerer Säure- und Gerbstoffgehalt bei mäßiger Temperatur den Milchsäurestich

nahezu zu verhindern vermögen, so kann der Einfluß des rechtzeitigen Abzuges deutlich zur Geltung gelangen. Ebenso verhält es sich mit dem Zusatz von schwefliger Säure in der einen oder anderen Form; für sich allein und in mäßiger Menge angewendet, ist diese Verbindung oft nicht imstande, den Milchsäurestich zu verhindern; allein in Verbindung mit den anderen hemmenden Faktoren kann sie wertvolle Dienste leisten, besonders, wenn sie schon vor der Gärung zugefügt wird. Auch eine richtige Anwendung von Reinhefe vermag einen gewissen Schutz gegen den Milchsäurestich auszuüben, namentlich von solchen Reinhefen, die den Gehalt an nicht flüchtiger Säure eher erhöhen als erniedrigen.

Nach dem Gesagten wird man am ehesten den Milchsäurestich verhindern können, indem man alle die Bakterien hemmenden Faktoren miteinander vereinigt, zunächst danach trachtet, dem Traubensaft durch rechtzeitige Ernte, den Obstsäften durch das gleiche Mittel sowie durch Mischungen milder mit sauren Säften oder durch Mischung so beschaffener Früchte einen nicht zugerungen Säuregehalt zu verleihen, sodann eine geeignete Reinhefe anwendet, eine niedere Gärtemperatur vorzieht, den Abzug von der Hefe rechtzeitig vornimmt und die abgezogenen Weine kühl lagert. In manchen Fällen kann ein höherer Gerbstoffgehalt die Wirkung der Säure erhöhen und ebenso empfiehlt es sich da, wo die natürlich gegebenen Schutzmittel ungenügend erscheinen, sie durch Zufuhr von schwefliger Säure zu unterstützen.

3. Der Mäuselgeschmack.

Bei den Versuchen mit reinen Zuckerarten (p. 166) hat sich herausgestellt, daß *Bacterium manniopœum* bei der Zersetzung von Lävulose, Dextrose und Saccharose die Erscheinung des Mäuselgeschmacks hervorruft, d. h. Geruch und Geschmack der Kulturflüssigkeit erinnern an denjenigen von Acetamid. Wir sehen hier von der Aufstellung von Hypothesen, wie diese Erscheinung zustande kommen könnte, ab und beabsichtigen nur noch einige Fälle mitzuteilen, wo im Traubenweine durch Zusatz von *Bacterium manniopœum* oder durch spontanes Auftreten dieses Organismus diese Krankheit hervorgerufen wurde. Bei dem auf p. 198 erwähnten Burgunder Wein, den man teilweise entsäuerte, mit etwas Zucker versah und nach der Sterilisation mit *Bacterium manniopœum* impfte, trat eine erhebliche Umsetzung des Zuckers ein und es wurde dann auch der Mäuselgeschmack deutlich bemerkbar. Denselben Erfolg erzielte *Bacterium manniopœum* auch in einem ähnlich behandelten Gutedelwein. Andererseits konnten in Weinen, in denen der Mäuselgeschmack spontan aufgetreten war, zu wiederholten Malen die Produkte des Milchsäurestiches und *Bacterium manniopœum* in großer Zahl nachgewiesen werden. So enthielt ein verdorbener Weißwein aus Süd-Italien, der einen ausgeprägten Mäuselgeschmack aufwies, 7,29⁰/₁₀₀ Gesamtsäure (als Äpfelsäure), 3,92⁰/₁₀₀ flüchtige Säure (als Essigsäure), 2,98⁰/₁₀₀ nicht flüchtige Säure und 3,7⁰/₁₀₀ Milchsäure. In den Flaschen be-

fand sich ein Trub, bestehend aus einer großen Masse von *Bacterium mannitopœum* und daneben allerdings auch noch aus Essigbakterien.

Ferner enthielt ein Rotwein mit deutlichem Mäuselgeschmack im Trub fast ausschließlich Bakterien vom Typus des *Bacterium mannitopœum* t. Mäuselgeschmack wird also durch *Bacterium mannitopœum* verursacht und da diese Bakterien hauptsächlich in zuckerhaltigen Flüssigkeiten sich vermehren und wirken, so ist begreiflich, daß nach Umgärung von Wein unter Zusatz von Zuckerlösung gerne auch der Mäuselgeschmack sich bemerkbar macht.

4. Das Umschlagen der Weine.

In dem einleitenden Kapitel über die bisherigen Kenntnisse von den durch Bakterien im Wein verursachten Veränderungen haben wir auf p. 137 auf Grund einer einläßlichen Besprechung der einschlägigen Literatur versucht, diese Krankheit zu definieren. Es führte dies dazu, die Erscheinung, die die Franzosen als „Pousse“ bezeichnen, von der Krankheit „Tourne“ zu trennen und als eine Begleiterscheinung verschiedener durch Bakterien verursachter Veränderungen mit Kohlensäureentwicklung aufzufassen. So würde also die „Pousse“ verbunden sein können mit dem einfachen Säureabbau, aber auch mit dem Milchsäurestich und endlich mit der „Tourne“. Denn bei all diesen Vorgängen findet eine Kohlensäureentwicklung statt. Es kann nun nicht auffällig erscheinen, daß mehrere französische Autoren „Tourne“ und „Pousse“ als eine einheitliche Krankheitserscheinung zusammenfassen, andere dagegen sie als 2 gesonderte charakteristische Krankheiten trennen. Unserer Auffassung entsprechend würden wir uns hier nur noch mit der eigentlichen „Tourne“ zu beschäftigen haben. Leider reichen die vorliegenden Mitteilungen nicht aus, diese Krankheit so scharf zu charakterisieren, daß man sie von den anderen Krankheitserscheinungen deutlich abtrennen könnte. Wohl hat Duclaux den Nachweis geliefert, daß bei den von ihm untersuchten Weinen, die die Erscheinung des Umschlagens zeigten, stets Propionsäure gebildet wurde und daß diese nach seiner Auffassung ein charakteristisches Gärprodukt des Umschlagens sei, herrührend von einer Weinsteinvergärung. Es ist aber damit doch nicht der Beweis geliefert, daß alle Weine, die bei der Sinnenprüfung sich als umgeschlagen kennzeichnen, aus Weinstein gebildete Propionsäure enthalten. So hatten wir schon öfters Weine vor uns, die man nach den Beschreibungen Pasteurs und anderer französischer Forscher als umgeschlagen betrachten mußte, deren flüchtige Säure aber nach Duclauxs Methode sich nur als Essigsäure ohne Beimengung von Propionsäure erwies. Unsere Untersuchung ist auf diesem Spezialgebiet noch nicht so weit vorgeschritten, daß wir eine Definition des Umschlagens geben könnten; allein wir haben wiederholt den Eindruck gewonnen, daß, wenn in Rotweinen, der Säureabbau weit vorgeschritten ist, sekundäre Umsetzungen (Entfärbung des Weines und Ausscheidungen, Trübungen) eintreten, die dem Weine nicht nur das eigentümliche schokoladenfarbige Aussehen umgeschlagener Weine verleihen, sondern auch Geruchs- und Geschmackserscheinungen hervorrufen, die für solche Weine charakteristisch sind.

Bei einem Versuch wurde einem teilweise entsäuerten und mit 1 Proz. Zucker versehenen Clävner Wein, der vollständig klar war und eine schön rubinrote Farbe zeigte, nach vorgenommener Sterilisation, eine Reinkultur unseres *Micrococcus acidovorax* zugefügt. Nach 8 Wochen,

während welchen anfänglich eine lebhaftere Kohlensäureentwicklung stattfand, zeigte sich der Wein mit den Bakterien stark getrübt, schokoladenfarbig. Der rote Farbstoff war größtenteils verschwunden, während auf dem Boden ein dickes Depot von dunkelbrauner bis schwärzlicher Färbung sich befand. Auch Geruch und Geschmack waren die von umgeschlagenem Rotwein. Der Wein ohne Bakterien war zu dieser Zeit noch unverdorben im Geschmack und vollständig klar und besaß die erwähnte schöne rote Farbe. Die chemische Untersuchung ließ starke Umsetzungen erkennen. Der ursprüngliche Wein enthielt $2,94^{\circ}/_{\infty}$ Gesamtsäure als Äpfelsäure und $0,14^{\circ}/_{\infty}$ flüchtige Säure (als Essigsäure), der kranke dagegen $7,34^{\circ}/_{\infty}$ Gesamtsäure, $0,31^{\circ}/_{\infty}$ flüchtige Säure und außerdem $11,24^{\circ}/_{\infty}$ Milchsäure. Da wir *Micrococcus acidovorax* als energisch säureabbauenden Organismus kennen, so dürfen wir wohl annehmen, daß zuerst die Säure unter Bildung von Milchsäure abgebaut wurde. Infolge des Säureschwundes werden denn auch die sekundären Veränderungen, die der Erscheinung des Umschlagens eigen sind, eingetreten sein. Dann hat aber der *Micrococcus* auch noch Zucker zersetzt und zwar in der für ihn charakteristischen Art, unter Bildung von viel Milchsäure und wenig flüchtiger Säure. Neben dieser Erscheinung des Umschlagens trat in diesem Falle auch die der „Pousse“ auf, was begreiflich ist, da beim Säureabbau durch *Micrococcus acidovorax* Kohlensäure gebildet wird.

Im vorstehenden Beispiel wurden durch einen säureabbauenden *Micrococcus* die Erscheinungen des Umschlagens herbeigeführt. Es ist nun wohl anzunehmen, daß der gleiche Erfolg eingetreten wäre, wenn der Säureabbau durch einen anderen Organismus vollzogen worden wäre, vielleicht durch *Bacterium gracile* oder *Bacterium mannitolopæum* oder durch mehrere dieser Arten zusammen. Damit wollen wir uns heute noch nicht dahin aussprechen, daß das Umschlagen stets eine Folge des Säureabbaues sei, allein wir haben doch bei unseren Beobachtungen bei kranken Weinen den Eindruck gewonnen, daß zwischen den beiden Erscheinungen ein enger Zusammenhang besteht. Gewiß führt nicht jeder Säureabbau zum Umschlagen. Es wird dies meist nur in den Fällen eintreten, wo der Säuregehalt anfangs schon gering ist und durch den Säureabbau unter eine gewisse für die Erhaltung der normalen Weinbeschaffenheit erforderliche Grenze hinabsinkt. Häufig werden im Anschluß an den schwachen Säureabbau weitere durch Bakterienverursachte Zersetzungen sich einstellen, wobei Milchsäure entsteht und der Gehalt an Gesamtsäure wieder erhöht wird. Es kann dann nicht überraschen, wenn einzelne Forscher die umgeschlagenen Weine als fade, andere sie als stichig bezeichnen. In dem Trub eines solchen Weines wird man dann naturgemäß verschiedene Bakterien finden können, solche, die den Säureabbau besorgten und andere, die Milchsäurestich, Essigstich usw. verursachten.

Von den von uns beobachteten umgeschlagenen Weinen mögen nur einige hier Erwähnung finden. Der erste, ein Rotwein vom Hallwilersee im Kt. Aargau trübte sich nach der Gärung und zwar nahm die Trübung nach dem Abzug noch bedeutend zu. Gleichzeitig fand eine lebhaftere Kohlensäureentwicklung statt. In diesem Wein, der die Beschaffenheit eines umgeschlagenen Weines zeigte, fanden sich, soweit sich nach der äußeren Beschaffenheit beurteilen läßt, *Bacterium mannitolopæum* in großer Zahl, daneben etwas weniger *Bacterium gracile* und sehr viele *Micrococcus variococcus* h (aus diesem Wein wurde auch der eben genannte Organismus gewonnen).

Ein Rotwein von Schaffhausen (1909), den man im Frühjahr 1910 auf Flaschen gezogen hatte, fing an, sich stark zu trüben. Beim Öffnen der Flaschen zeigte sich ein starkes Moussieren. Der Wein schmeckte stark säuerlich, erhielt nach und nach eine bräunliche Färbung und enthielt zahlreiche Bakterien und zwar vorwiegend vom Typus des *Bacterium mannitopæum* (siehe Taf. III, Fig. 27), teils Stäbchen, teils lange gegliederte und ungegliederte Fäden von 0,8–1,0 μ Dicke; daneben fand sich noch ein Micrococcus in Form von Einzelkokken, Diplokokken und Tetraden. Zusammensetzung siehe nachstehende Tabelle.

Ebenso zeigte ein dritter Rotwein von Mayenfeld (1909) im oberen Rheintal die Beschaffenheit eines umgeschlagenen Weines. Der Wein wurde schließlich dick-trüb, schokoladefarbig und moussierte stark. Er enthielt zahlreiche Bakterien vom Typus des *Bacterium mannitopæum*, gewissermaßen eine Reinkultur (Taf. III, Fig. 28). Ähnlich wie der vorige Wein bildete er ein dunkles Depot, aus den genannten Bakterien und Ausscheidungen des Weines bestehend. Entsprechend dem Jahrgang besaßen die Weine einen ziemlich hohen Säuregehalt. Derselbe ist aber durch Abbau bedeutend vermindert worden; voraussichtlich wurde die gesamte Äpfelsäure abgebaut und die zur Zeit der Untersuchung bestimmte nicht flüchtige Säure bestand aus Weinsäure (wahrscheinlich 2–3°/∞), Milchsäure und etwas Bernsteinsäure. Nicht alle Milchsäure stammt vom Säureabbau her, denn wie der Gehalt an flüchtiger Säure erkennen läßt, ist wahrscheinlich auch etwas Zucker infolge Milchsäuregärung zerlegt worden.

	Gesamt- säure als Äpfelsäure g im l	Flüchtige Säure als Essigsäure g im l	Nicht flüch- tige Säure als Äpfelsäure g im l	Milchsäure g im l	Gesamt- zucker als Invertzucker g im l	Alkohol g im l
Schaffhauser 1909er Rotwein	6,14	1,75	4,22	4,16	0,0	50,5
Mayenfelder 1909er Rotwein	7,74	1,86	5,89	5,16	0,0	82,4

Bei unseren Untersuchungen umgeschlagener Weine haben wir nach der Duclauxschen Methode mehrmals die Art der flüchtigen Säure im kranken Wein bestimmt, so auch bei den vorstehenden Rotweinen vom Hallwilersee und von Mayenfeld. Im nachfolgenden sollen die der Tabelle II von Duclaux (1; p. 388) entsprechenden Zahlen angegeben werden. Da die Werte von Duclaux nach reinen Säurelösungen bestimmt wurden, der Alkohol aber die Mengen der Destillationsprodukte wesentlich beeinflusst, haben wir neben seinen Zahlen der Essigsäure und Propionsäure auch diejenigen bestimmt, die sich bei der fraktionierten Destillation von Essigsäure in einer ca. 7-proz. wässrigen Alkohollösung ergaben und endlich die der beiden kranken Weine.

Diese Zusammenstellung zeigt, wie nebenbei erwähnt sein möge, daß die für reine Säurelösungen gefundenen Werte wegen des vorhandenen Alkohols nicht gut für Weindestillate verwendet werden können. Es eignet sich dazu besser eine Zahlenreihe, die auf Grund einer alkoholhaltigen Essigsäurelösung aufgestellt wurde. Vergleichen wir mit dieser die bei den Weinen gefundenen Ergebnisse, so finden wir eine ziemlich Übereinstimmung; die

T a b e l l e 89.

	Essigsäure	Propion- säure	Essigsäure ohne Al- kohol	Essigsäure + ca. 7 Gew. % Alkohol	Flüchtige Säure im „Hall- wyler“	Flüchtige Säure im „Mayen- felder“
	(nach Duclaux)		(nach unserer Be- stimmung)			
10 ccm	7,4	12,1	7,3	4,4	3,8	3,7
20 „	15,2	24,0	15,4	11,5	9,7	9,3
30 „	23,4	35,3	23,6	19,6	17,2	16,2
40 „	32,0	46,2	32,6	28,1	25,9	24,3
50 „	40,9	56,8	41,6	37,6	35,3	33,7
60 „	50,5	66,7	51,5	48,3	45,9	43,7
70 „	60,6	76,2	61,8	59,4	56,6	55,0
80 „	71,9	85,0	73,3	71,3	69,3	68,1
90 „	84,4	93,0	85,8	80,4	83,4	82,5
100 „	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

hier gefundenen Zahlen sind eher noch etwas niedriger, was auf Anwesenheit kleiner Mengen von Ameisensäure hindeuten könnte. Auf alle Fälle war keine Propionsäure vorhanden; denn dann müßten die Werte jeweils größer sein als die für Essigsäure gefundenen.

Kapitel V.

Anwendung der gewonnenen Versuchsergebnisse bei der Beurteilung von Weinen.

Die Beurteilung der Weine bei der Lebensmittelkontrolle geschah bisher gewöhnlich auf Grund der Sinnenprüfung einerseits und einer chemischen Analyse andererseits, die sich in der großen Mehrzahl der Fälle auf wenige Bestandteile wie Alkohol, Gesamtsäure, flüchtige Säure, Extrakt, Mineralstoffe bezog. In neuerer Zeit hat man nun in richtiger Erkenntnis, daß die Milchsäure einen wesentlichen, regelmäßig vorkommenden Bestandteil der Weine bildet, auch diese in den Kreis der quantitativen Bestimmungen hineinbezogen. Vergl. z. B. Baragiola und Godet (1). Nun kann aber, wie unsere Untersuchungen unzweifelhaft dartun, die Milchsäure auf verschiedenem Weg in den Wein gelangen, und da dies für seine Beurteilung von größter Bedeutung ist, sollte die chemische Untersuchung auch hierüber Auskunft geben. Das ist aber nur möglich bei Zuziehung der bakteriologischen Prüfung.

Sämtliche der hier eingehender besprochenen Weinbakterien sind Milchsäurebildner. Allein ihre Fähigkeit, Milchsäure aus den ursprünglichen Weinbestandteilen zu bilden, ist außerordentlich verschieden. Zudem unterscheiden sie sich auch noch durch die neben der Milchsäure entstehenden Produkte. Da nun, wie wir in dieser Arbeit dargetan haben, die Bakterienarten in dieser Beziehung eine gewisse Konstanz zeigen, läßt sich umgekehrt aus dem Auftreten der Milchsäure und der Nebenprodukte (flüchtige Säure usw.) oft auch ein Rückschluß auf die tätig gewesenen Bakterien ziehen. In vielen Fällen würde man jedoch auf diesem Wege allein zu einem richtigen Einblick in die stattgehabten Vorgänge nicht gelangen, und es ist dann hierzu unbedingt eine sachgemäße Prüfung der Bakterienflora notwendig.

Zu den wichtigsten Feststellungen bei einer Weinanalyse gehört die Bestimmung der Gesamtsäure, flüchtigen Säure und Milchsäure. Bezüglich des gegenseitigen Verhältnisses der beiden letzteren Säuren sind verschiedene Möglichkeiten geboten, die wir im nachfolgenden übersichtlich zusammenstellen wollen, um jeweils festzustellen, auf welche Weise das betreffende Verhältnis im Wein zustande kommen kann. Ein zur Kontrolle gelangender Wein kann enthalten:

1. Wenig Milchsäure und wenig flüchtige Säure.

In diesem Falle handelt es sich gewöhnlich um gesunde Weine, die aus anderen Gründen zur Untersuchung gelangen. Dementsprechend wird man im Trub nur vereinzelte Bakterien finden. Damit ist selbstverständlich bezüglich der Reellität des Weines nichts entschieden, selbst dann nicht, wenn der Gesamtsäuregehalt ein geringer ist. Immerhin wird letzterer Umstand dann zu weiterer Untersuchung führen können. Gelegentlich zeigen auch fehlerhafte Weine dieses Verhältnis von Milchsäure und flüchtiger Säure wie z. B. im folgenden Falle.

Ein 1911er Rotwein von Herdern (Kt. Thurgau), der anfangs Juli 1912 vom Besitzer eingeschickt wurde, weil er sich trübte, nachdem er vorher vollständig klar geworden war, enthielt jetzt $7,7^{\circ}/_{\infty}$ Gesamtsäure als Äpfelsäure; $0,6^{\circ}/_{\infty}$ flüchtige Säure als Essigsäure und $1,18^{\circ}/_{\infty}$ Milchsäure. Sowohl nach diesen Ergebnissen als auch nach der Kostprobe erschien der Wein als gesund. Die mikroskopische Prüfung ergab jedoch die Anwesenheit von Mikrokokken, wenn auch noch in geringer Zahl und zwar nach dem Aussehen zu schließen, *Micrococcus acidovorax*. Daraus geht hervor, daß der Wein bisher noch keine Folgen einer Bakterientätigkeit zeigt, daß aber aller Wahrscheinlichkeit nach der Abbau der Säure durch den genannten *Micrococcus* begonnen hat. Die Trübung des Weines ist nicht durch die wenigen Bakterien allein verursacht worden, sondern auch durch Ausscheidungen. Fände man in einem Wein mit gleichen Säureverhältnissen keine Bakterien, so würde derselbe ebenfalls als gesunder Wein beurteilt, bei dem aber ein Säureabbau noch nicht in Aussicht steht. Hierher wird die Großzahl richtig behandelter Jungweine gehören, bevor der Säureabbau eingetreten ist.

2. Viel Milchsäure und wenig flüchtige Säure.

In Weinen, die dieses Verhältnis zeigen, hat in der Regel ein Säureabbau stattgefunden; die mikroskopische Untersuchung wird dann Aufschluß geben, durch welche Bakterien der Abbau verursacht wurde. In der Regel wird man bei unseren Weinen und Obstweinen *Bacterium gracile* finden. Doch sind uns auch Fälle vorgekommen, wo der Säureabbau durch *Micrococcus acidovorax* und *Micrococcus variococcus* stattfand, von denen der 1. Kokken von $0,5 \mu$ Durchmesser, der 2. Kokken verschiedener Größe von $0,7$ — $1,5 \mu$ aufweist.

Finden sich Kokken von 1μ , so könnte es sich um diesen letzteren *Micrococcus* oder um den *Micrococcus malolacticus* handeln. Es soll hier nicht unerwähnt bleiben, daß unsere beiden *Micrococcus* auch Zucker umsetzen können unter Bildung von viel Milchsäure und wenig flüchtiger Säure. Ein Wein, in dem diese Erscheinung sich zeigte, wird also auch in diese Gruppe gehören, während bei Umsetzung von Zucker durch unsere beiden

Bacterium-Arten, sowie durch *Micrococcus malolacticus* neben Milchsäure auch viel flüchtige Säure erzeugt wird. Der Säureabbau im Wein ist eine so regelmäßig auftretende Erscheinung, daß es genügt, hier nur ein Beispiel aufzuführen.

Ein 1911er Rotwein von Buchberg im St. Galler Rheintal enthielt anfangs Januar 1912 neben 82 Gewichts- $\frac{0}{100}$ Alkohol 3,34 $\frac{0}{100}$ Gesamtsäure (als Äpfelsäure), 0,62 $\frac{0}{100}$ flüchtige Säure (als Essigsäure) und 2,70 $\frac{0}{100}$ Milchsäure. Der Gehalt von 0,62 $\frac{0}{100}$ flüchtiger Säure ist für Rotwein bei der üblichen Herstellungsart kein hoher. Da die im Trub sich vorfindenden Bakterien als zu *Bacterium gracile* gehörig erkannt wurden, kann hier keine Zuckerzersetzung durch dieselben stattgefunden haben, denn sonst hätte der Gehalt an flüchtiger Säure zugenommen. Die gefundene Milchsäure stammt also ausschließlich vom Abbau der Äpfelsäure her. Wenn auch der Wein zur Zeit der Untersuchung noch gesund erschien, so ist doch seine Zusammensetzung keine befriedigende; der Gehalt an nicht flüchtiger Säure ist zu gering, nur 2,66 $\frac{0}{100}$. Rechnet man hiervon noch die neu gebildete Milchsäure ab, so ergibt sich, daß in diesem Weine die Äpfelsäure ganz abgebaut ist und er nur wenig Weinsäure enthält. Ein so beschaffener Wein wird gerne schwarz und hat außerdem die Neigung zum Umschlagen.

Das hier berücksichtigte Verhältnis von viel Milchsäure und wenig flüchtiger Säure könnte allerdings auch künstlich herbeigeführt werden, indem man einem verdünnten Wein strafbarerweise Milchsäure zusetzte, um so die Fälschung zu verdecken und einen Wein mit Säureabbau vorzutäuschen. Eine mikroskopische Untersuchung des Trubes würde aber in manchen Fällen hierüber Aufschluß geben können; es werden eben dann die säureabbauenden Bakterien fehlen.

3. Wenig Milchsäure und viel flüchtige Säure.

Hierher gehören vor allem jene Weine, die schon frühzeitig vor dem Säureabbau infolge unrichtiger Behandlung essigstichig geworden sind. Je nach der Stärke des Essigstiches erreicht die Menge der flüchtigen Säure einen verschiedenen Grad.

Da auch die Kahlmhefen flüchtige Säure erzeugen, kann das vorgenannte Verhältnis von Milchsäure und flüchtiger Säure auch in Weinen mit einer Kahlmdecke sich einstellen, wobei dann allerdings der Gehalt an flüchtiger Säure nicht die Höhe erreicht, wie sie bei Essigstich eintreten kann. Sowohl der Ursprung der flüchtigen Säure im 1. als im 2. Fall läßt sich durch die mikroskopische Untersuchung leicht nachweisen. Selbst in zum Versand entnommenen Proben gelingt es in der Regel, die von der Decke herabgesunkenen Essigbakterien oder Kahlmhefen aufzufinden. (Wir betrachten es als selbstverständlich, daß die zu solcher mikroskopischen Untersuchung verwendeten Weine nicht längere Zeit in angebrochenen Flaschen stehen geblieben sind.)

Falls der Milchsäuregehalt über 1 $\frac{0}{100}$ beträgt, so ist anzunehmen, daß neben der Erzeugung flüchtiger Säuren durch Essigbakterien oder Kahlmpilz noch eine Bildung von Milchsäure, entweder durch säureabbauende Bakterien oder durch Umsetzung von Zucker durch Bakterien stattfand. Diese Annahme wird sich dann durch den mikroskopischen Befund in manchen Fällen noch bestätigen lassen.

In Beerenweinen, wo Zitronensäure zur Vergärung gelangt, kann allein durch den Abbau dieser Säure neben wenig Milchsäure viel flüchtige Säure

entstehen. Man wird in diesem Falle u. a. das *Bacterium mannitopæum* und *Bacterium gracile* als Ursache des Säureabbaues nachweisen können. Ähnliches könnte natürlich auch eintreten, wenn man einem verdünnten Wein Zitronensäure zusetzte oder Beerensaft, um neben dem Gehalt an Säure auch denjenigen an Extrakt zu erhöhen.

4. Viel Milchsäure und viel flüchtige Säure.

In der Regel wird ja die Menge der flüchtigen Säure die der Milchsäure nicht erreichen. 2—3 ‰ flüchtige Säure kann schon als viel gelten.

Die häufigst vorkommenden hierher gehörigen Fälle dürften die Weine mit Milchsäurestich bilden, der meist verursacht wird durch *Bacterium mannitopæum*, das Mannitferment von Gayon und Dubourg, oder in Ausnahmefällen auch durch *Bacterium gracile*. Erstere beide Organismen werden durch die mikroskopische Untersuchung leicht festzustellen sein, da sie verhältnismäßig leicht zu erkennen sind und meist in großer Zahl sich vorfinden.

Schwieriger ist die Beurteilung, wenn in einem solchen Wein *Bacterium gracile* sich vorfindet, das, wie eben erwähnt wurde, ausnahmsweise Milchsäurestich erzeugen kann. Häufiger wird der Fall vorliegen, daß das *Bacterium gracile* nur den Säureabbau unter Bildung von viel Milchsäure vollzogen hat, während die nachgewiesene flüchtige Säure durch Essigbakterien gebildet wurde. Man ist jedoch in der Lage, nachzuweisen, ob die eine oder andere dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, indem man eine Mannitbestimmung vornimmt. Beim Zustandekommen des Milchsäurestiches durch *Bacterium gracile* würde in der Regel Mannit nachzuweisen sein, wenn auch oft nur auf mikroskopischem Wege; beim Auftreten von viel Milchsäure und viel Essigsäure auf dem 2. Wege wäre dagegen kein Mannit vorhanden.

Bei der Entscheidung, ob man es in solchen Fällen mit Milchsäurestich zu tun hat, oder ob säureabbauende Bakterien und Essigbakterien zusammenwirkten, wird man außer der mikroskopischen Untersuchung zweckmäßigerweise auch noch die Sinnenprobe zuziehen. Je nachdem das Verhältnis viel Milchsäure und viel flüchtige Säure auf die eine oder andere der beiden beschriebenen Arten zustande kam, würden Geruch und Geschmack des Weines sehr verschieden sein. Die den eigenartigen Geruch und Geschmack des milchsäurestichigen Weines bedingenden Ester werden bei der getrennten Bildung der Milchsäure durch säureabbauende Bakterien und der flüchtigen Säure durch Essigbakterien nicht beobachtet.

Als Beispiel für Milchsäurestich mag ein mit Tresterwein vermengter Wein 1911 aus dem Züricher Weinland dienen. Er enthielt im Juni 1912 3,75 ‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure); 2,00 ‰ flüchtige Säure (als Essigsäure) und 2,81 ‰ Milchsäure. Der in der Probeflasche sich absetzende Trub bestand aus *Bacterium mannitopæum* und gewährte das Aussehen einer Reinkultur dieses Organismus. Die Kostprobe ließ den Milchsäurestich erkennen. Hier haben wir es mit einem ausgeprägten Fall des Milchsäurestiches zu tun, mit dem ein Säureabbau verbunden war.

Ein Rotwein 1909 (Immenberger, Kt. Thurgau) enthielt 5,82 ‰ Gesamtsäure als Äpfelsäure, 1,36 ‰ flüchtige Säure (als Essigsäure) und 2,92 ‰ Milchsäure. Die mikroskopische Untersuchung ergab die Anwesenheit von *Bacterium gracile*, wenn auch nicht in großer Zahl und Essigbak-

terien. Hierbei ist natürlich zu berücksichtigen, daß im Faß, aus welchem die Flasche gefüllt wurde, das *Bacterium gracile* sich wohl zum größten Teile abgesetzt hat, während die Essigbakterien teils an der Oberfläche sich befinden und wohl auch zum Teil schon wieder auf den Boden gesunken sind. Immerhin gibt der Befund Anhaltspunkte, festzustellen, daß im Wein ein Säureabbau stattgefunden hat und ein schwacher Essigstich eingetreten ist. Der läßt sich nun mit den gefundenen Säurewerten vollständig in Einklang bringen. Ebenso ließ auch die Kostprobe erkennen, daß man es nicht mit einem milchsäurestichigen sondern schwach essigstichigen Wein zu tun hatte.

An Stelle von *Bacterium gracile* kann ein dem Essigstich vorangehender Säureabbau durch eine unserer *Micrococcus*-Arten verursacht werden und es würde dann auch das soeben erwähnte Verhalten eines Weines eintreten.

Micrococcus malolacticus, Seifert, wäre unter Umständen ebenfalls imstande, in einem Wein neben viel Milchsäure ziemlich viel flüchtige Säure zu erzeugen, wenn er zunächst etwas Zucker zersetzen würde unter Bildung von verhältnismäßig viel flüchtiger Säure und darauf zum Säureabbau überginge, wobei dann viel Milchsäure entstünde.

Herrscht im Verhältnis zur flüchtigen Säure die Milchsäure stark vor, so wird man annehmen dürfen, daß zwei Vorgänge zusammenwirkten, nämlich Milchsäurestich und nachher oder gleichzeitig auftretender Säureabbau. Bei 2,0 ‰ flüchtiger Säure und 6 ‰ Milchsäure würde auf den Milchsäurestich die gesamte Essigsäure und etwa die Hälfte der Milchsäure fallen, während die andere Hälfte der letzteren dem Säureabbau zuzuschreiben wäre. In solchen Fällen wird man *Bacterium mannitolopœum* feststellen können, unter Umständen daneben auch noch *Bacterium gracile* oder eine *Micrococcus*-Art vorfinden.

Auch ein schon erwähnter, bitter gewordener Wallenstadter 1910er Rotwein möge hier noch angeführt werden. Er enthielt 6,07 ‰ Gesamtsäure (als Äpfelsäure), 1,84 ‰ flüchtige Säure (als Essigsäure), 4,05 ‰ nicht flüchtige Säure (als Äpfelsäure) und 5,04 ‰ Milchsäure. Der geringe Gehalt an nicht flüchtiger Säure, die außerdem zu einem großen Teil aus Milchsäure besteht, weist darauf hin, daß hier jedenfalls ein starker Säureabbau stattgefunden hat, während andererseits ein Teil der 1,84 ‰ flüchtigen Säure aus Zucker entstanden sein wird.

In Fällen, wo bei Vorhandensein von viel Milchsäure und Essigsäure die letztere vorwiegt, hat man es meist nicht mit Säureabbau, verbunden mit Essigstich, zu tun, sondern mit einem Zusammenwirken von Milchsäurestich mit Essigstich. Neben den Essigbakterien wird man noch *Bacterium mannitolopœum* finden.

Eine interessante Erscheinung, die bei der Beurteilung mehr als bisher berücksichtigt werden sollte, ist der von uns öfters beobachtete Umstand, daß die Milchsäure, sei sie in größerer oder geringerer Menge vorhanden, bei der Bestimmung der Gesamtsäure nur zum Teil zur Geltung kommt. Es gibt sogar Weine, deren Milchsäuregehalt denjenigen an nicht flüchtiger und hier und da auch an Gesamtsäure übersteigt. Wenn säurereiche Traubensäften durch Calciumkarbonat teilweise entsäuert werden, so erhält man in der Regel Weine mit einem hohen Prozentsatz gebundener Milchsäure.

Für die Anwendung des in diesem Abschnitte Ausgeführten bei der Beurteilung von Weinen dürfte eine auf die wesentlichsten Merkmale sich stützende analytische Zusammenstellung der wichtigsten bisher genau beschriebenen und beobachteten Weinbakterien, mit Ausnahme der Essigbakterien und Bakterien der linden Weine, gelegentlich gute Dienste leisten.

I. Stäbchen- und Fadenbakterien:

A. 0,7—1,3 μ Dicke, können Zucker unter Bildung von Milchsäure und Essigsäure vergären, Lävulose unter Bildung von Mannit.

a) Zersetzt l-Arabinose, geringe Mengen von Zitronensäure, nicht aber Milchzucker:

Bact. mannito pœum Müller-Thurgau.

b) Zersetzt Milchzucker, nicht aber l-Arabinose und Zitronensäure:

Mannitferment von Gayon u. Dubourg.

B. 0,4—0,6 μ Dicke, baut energisch Äpfelsäure ab unter Bildung von Milchsäure und Kohlensäure, Zucker unter Bildung von Milchsäure und Essigsäure.

Bact. gracile Müller-Thurgau.

II. Kokken, Diplokokken und Tetraden:

Äpfelsäure abbauend.

A. Vergären Dextrose und Lävulose unter Bildung von Milchsäure.

a) 0,5—0,7 μ Dicke, greift Amygdalin nicht an, dagegen Maltose und Milchzucker.

Micr. acidovorax Müller-Thurgau u. Osterwalder.

b) 0,7—1,5 μ Dicke, greift Amygdalin energisch an, dagegen nicht Maltose und Milchzucker.

Micr. variococcus Müller-Thurgau u. Osterwalder.

B. Vergärt Dextrose unter Bildung von flüchtiger Säure, nicht aber von Milchsäure, greift Lävulose nicht an. 1,0 μ Dicke.

Micr. malolacticus Seifert.

Mehrere Unterscheidungsmerkmale lassen sich mittels des Mikroskops allein feststellen. Wenn es sich aber darum handelt, Bakterien von gleicher äußerer Beschaffenheit voneinander zu unterscheiden und dies nun unter Benützung des angegebenen Verhaltens gegenüber Zuckerarten, Säuren und anderen Stoffen geschehen soll, so ist wohl eine Reinzüchtung der Bakterien mittels Plattenkultur nicht zu umgehen. Für solche Fälle erleichtert es dann die weitere Prüfung, wenn die erforderlichen Lösungen in kleine Flaschen abgefüllt und sterilisiert zur Verfügung stehen.

Verschiedene Erfahrungen, die wir im Vorstehenden noch nicht mitteilen wollten, brachten uns zu der Überzeugung, daß außer den eben angeführten, noch einige andere Bakterien im Wein eine bedeutsame Rolle spielen können. Wir betrachten also unsere Arbeit nicht als eine abgeschlossene, hegen aber die Hoffnung, daß sie sowohl für die auf dem Weingebiete arbeitenden Bakteriologen als auch für Weinchemiker von Nutzen sein wird.

Wädenswil, im August 1912.

Literatur.

- Aderhold, R., (1) Untersuchungen über reine Hefen. III. Teil. Die Morphologie der deutschen *S. ellipsoideus*-Arten. (Landw. Jahrb. Bd. 23. 1894. p. 587.)
- Babo, L. v., (1) Erzeugung und Behandlung des Traubenweins. 1846.
- Babo, A. Freiherr von, und Mach, Edmund, (1) Handbuch des Weinbaues und der Kellerwirtschaft. Bd. 1. Weinbau. 2. Aufl. 2. Kellerwirtschaft. 3. Aufl. 1896.
- (2) Handbuch des Weinbaues und der Kellerwirtschaft. Bd. 2. Kellerwirtschaft. 4. Aufl. Berlin 1910.
- Baragiola, W. J., und Godet, Ch., Die Wertung der Milchsäure bei der Weinbeurteilung. (Mitt. d. schweiz. Gesundheitsamtes. 1912. Heft 5. Erschien während der Drucklegung unserer Arbeit.)
- Bersch, J., (1) Praxis der Weinbereitung. Berlin 1889.
- Boersch, C., (1) Beitrag zur Kenntnis der Bakterien des Weines und zur Kenntnis der Hefen. [Dissert.] Erlangen 1893.
- Bordas, F., Joulin et de Raczkowski, (1) Sur l'amertume des vins. (Compt. rend. de l'acad. Paris. T. 126. p. 598; Kochs Jahresber. üb. Gärungsorgan. IX. p. 147.)
- (2) Amertume des vins. (Compt. rend. T. 126. p. 1291; Kochs Jahresber. IX. p. 148.)
- (3) Sur les microorganismes des vins dits tournés. (Compt. rend. T. 126. p. 1050; Kochs Jahresber. IX. p. 145.)
- Boussingault, (1) Agronomie, Chimie agricole et Physiologie. T. IV. 1868. p. 229.
- Burri, Rob., (1) Das Tuscheverfahren als einfaches Mittel zur Lösung einiger schwieriger Aufgaben der Bakterioskopie. Jena 1909.
- Charles, P., (1) Sur la caractéristique des vins de figue. (Compt. rend. T. 62. 1891. p. 811.)
- Dahlen, H. W., (1) Handbuch der Weinbereitung. Braunschweig 1878.
- Duclaux, E., (1) Traité de Microbiologie. T. III. Paris 1900.
- (2) Traité de Microbiologie. T. IV. Paris 1901.
- Fonseca, Ant. u. Chiaromonte, Tom., (1) Der Zusatz von Säuren zum Most und Wein. (Staz. speriment. agr. ital. Vol. 25. 1894. p. 20; Chem. C. 1894. I. p. 246; K. J. VII. p. 104.)
- Gautier, Arm., (1) Sur une maladie non encore décrite des vins du midi de la France, dits vins tournés. (Compt. rend. T. 86. 1878. p. 1338.)
- Gayon, U., (1) Maladies des vins. Progrès de la vinification. (Rapport. Exposition univers. de 1900. Congrès internat. de viticult. 1900.)
- Gayon, U. et Dubourg, E., (1) Sur les vins mannités. (Extr. d. Bull. du Ministère de l'Agricult. 1894. Auch in Annales de l'Institut. Pasteur. VIII. 1894. p. 108. K. J. V. p. 192.)
- (2) Nouvelles recherches sur le ferment mannitique. (Annal. de l'Institut. Pasteur. T. 15. 1901. p. 528.)
- Heim, Ludw., (1) Lehrbuch der Bakteriologie. 2. Aufl. Stuttgart 1898.
- Hellenthal-Beyse, (1) Hilfsbuch für Weinbesitzer und Weinhändler. 8. Aufl. 1869.
- Henneberg, W., (1) Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien der Brennereimaische, der Milch, des Bieres, der Preßhefe, der Melasse, des Sauerkohls, der sauren Gurken und des Sauerteiges, sowie einige Bemerkungen über die Milchsäurebakterien des menschlichen Magens. (Sonderabdr. a. „Zeitschr. f. Spiritusind.“ 1903. No. 22—31.)
- Huber, P., (1) Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt einiger Kern- und Steinobstsamen an blausäureliefernden Substanzen. (Landw. Versuchsstat. 1911. p. 462.)
- Jullien, (1) Der erfahrene Weinkellermeister. 5. Aufl. 1859.
- Kayser, E., (1) Contribution à l'étude de la fermentation lactique. II. (Annal. de l'Inst. Nat. agron. Sér. II. T. 3. 1904. p. 241.)
- Kayser, E. et Manceau, E., (1) Les ferments de la graisse des vins. Epernay 1909.
- Kelhofer, W., (1) Beiträge zur Kenntnis des Birngerbstoffes und seiner Veränderungen bei der Obstweinbereitung. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1908. p. 343.)
- Koch, Alfr., (1) Über die Ursachen des Verschwindens der Säure bei Gärung und Lagerung des Weines. (Weinbaukongr. Colmar; Weinbau und Weinhandel. Bd. 18. 1900. No. 40.)

- Kossowicz, A., (1) Einführung in die Mykologie der Genußmittel und in die Gärungsphysiologie. Berlin 1911.
- Kramer, E., (1) Die Bakteriologie in ihren Beziehungen zur Landwirtschaft und den landw. technischen Gewerben. T. 2. Wien 1892.
- Kruse, W., (1) Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910.
- Kulisch, P., (1) Über die Abnahme der Säure in Obst- und Traubenweinen während der Gärung und Lagerung. (Weinbau und Weinhand. 1889. No. 42—44; Landw. Jahrb. XIX. 1890. p. 83.)
- (2) Untersuchungen über das Böckern der Weine. (Weinbau und Weinhand. XIII. 1895. p. 2.)
- (3) Über die Veränderung des Säuregehaltes der Weine während der Gärung und Lagerung. (Weinbau und Weinhand. 1899. p. 12; Ber. d. Lehranst. Geisenheim. 1898/99. p. 93; K. J. 1899. p. 127.)
- Kunz, R., (1) Über das Vorkommen und Bestimmung der Milchsäure im Weine. (Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- und Genußmittel. 1901. p. 673.)
- Laborde, J., (1) Sur les ferments des maladies des vins. (Extr. d. Procès-Verb. d. séanc. de la Soc. d. Scienc. phys. et natur. de Bordeaux. 1898; Rev. de viticult. T. 9. 1898. p. 553.)
- (2) Influence de la composition du vin sur le développement du ferment de la tourne. (Rev. de viticult. 1901. p. 201.)
- (3) Sur le ferment de la maladie des vins poussés ou tournés. (Compt. rend. T. 138. 1904. p. 228.)
- (4) Sur les ferments des vins gras ou filants. (Extr. d. Procès-verb. d. séanc. de la Soc. d. Scienc. phys. et natur. de Bordeaux. 1904.)
- Lehmann, K. B., und Neumann, R. O., (1) Atlas und Grundriß der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 4. Aufl. München 1907.
- Löhnis, F., (1) Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. Berlin 1910.
- Maassen, A., (1) Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Spaltpilze. Die organischen Säuren als Nährstoffe und ihre Zersetzbarkeit durch die Bakterien. (Arbeit. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 12. 1896. p. 340.)
- Mach, Edmund, und Portele, K., (1) Nachweis und quantitative Bestimmung von Milch- und Buttersäure in Weinen, die aus verschlammten Trauben in verschiedener Weise hergestellt wurden. (Landwirtschaftl. Versuchsstat. Bd. 37. 1890. p. 305.)
- Mazé, P., et Pacottet, P., (1) Recherches sur les ferments des maladies des vins. (Rev. de viticult. T. 21. 1904. Auch in: Annal. de l'Institut. Pasteur. T. 18. p. 244.)
- Meißner, Richard, (1) Studien über das Zährwerden von Most und Wein. (Landw. Jahrbücher. Bd. 37. 1898. p. 715; Centralbl. f. Bak. Abt. II. Bd. 5. 1899. p. 232.)
- Migula, W., (1) System der Bakterien. 2 Bde. Jena 1897 und 1900.
- Möslinger, (1) Über die Säuren des Weines und den Säurerückgang. (Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- und Genußmitt. Bd. 4. 1901. p. 1120.)
- Müller-Thurgau, H., (1) Über die Ergebnisse neuer Untersuchungen auf dem Gebiete der Weinbereitung. (Ber. d. XII. Deutsch. Weinbaukongr. in Worms. Mainz 1891. p. 128.)
- (2) Eine bisher noch nicht beschriebene Weinkrankheit. (III. Jahresber. d. deutsch-schweiz. Versuchsstat. und Schule f. Obst-, Wein- und Gartenb. in Wädenswil. 1892/93. p. 93.)
- (3) Der Milchsäurestich der Obst- und Traubenweine. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. p. 849.)
- (4) Über den Einfluß der schwefligen Säure auf Entwicklung und Haltbarkeit der Obstweine. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 17. p. 11; auch im Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1905, sowie im Ber. d. Schweiz. Versuchsanst. f. Obst-, Wein- und Gartenb. in Wädenswil f. 1903 und 1904.)
- (5) Mannitgärung in Obst- und Traubenweinen. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1907.)
- (6) Bakterienblasen (Bakteriocysten). (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1908.)
- Müller-Thurgau, H., und Osterwalder, A., (1) Einfluß des Säuregehaltes auf den Verlauf der Gärung bei Obstweinen und die Zusammensetzung der letzteren. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1910. p. 259; auch im Ber. d. Schweiz. Versuchsanst. f. Obst-, Wein- und Gartenb. f. 1907/08.)
- (2) Weinhefen aus der Westschweiz. (Ber. d. Schweiz. Versuchsanst. f. Obst-, Wein- und Gartenb. f. 1909 und 1910; Landw. Jahrb. der Schweiz. 1912. p. 335.)

- (3) Einfluß reingezüchteter Hefen auf den Säuregehalt der Obstweine. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1912. p. 347 und Ber. der Schweiz. Versuchsanst. f. Obst-, Wein- und Gartenb. f. 1909 und 1910.)
- (4) Über den Säureabbau bei Obstweinen. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1912. p. 360; auch im Ber. d. Schweiz. Versuchsanst. f. Obst-, Wein- und Gartenb. f. 1909 und 1910.)
- (5) Über das Abziehen der Obstweine von der Hefe. I. Teil. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1908. p. 728; auch im Ber. d. Versuchsanst. Wädenswil f. 1905 und 1906.) Über das Abziehen der Obstweine von der Hefe. II. Teil. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1910. p. 273; auch im Ber. d. Versuchsanst. Wädenswil f. 1907 und 1908.) Über das Abziehen der Obstweine von der Hefe. III. Teil. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1912. p. 375; auch im Ber. d. Versuchsanst. Wädenswil f. 1909 und 1910.)
- (6) Weitere Versuche über den Einfluß der schwefligen Säure auf die Gärungsvorgänge in Obstweinen. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1912. p. 378; auch im Ber. d. Versuchsanst. Wädenswil f. 1909 und 1910.)
- Mulder, G. J., (1) Die Chemie des Weines. Leipzig 1856.
- Neßler, Julius, (1) Die Bereitung, Pflege und Untersuchung des Weines. 6. Aufl. Stuttgart 1894.
- Neßler-Windisch, (2) Die Bereitung, Pflege und Untersuchung des Weines. 8. Aufl. Stuttgart 1908.
- Neubauer, C., (1) Studien über den Rotwein. (Annal. d. Ömol. Bd. 2. 1872.)
- Osterwalder, A., (1) Über Schwefelwasserstoffbildung in Obst- und Traubenweinen. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1902; Weinbau und Weinhandel. 1903. p. 169.)
- Pacottet, P., (1) Vinification. Paris 1904.
- Pasteur, Louis, (1) Études sur le vin, ses maladies, causes qui les provoquent, procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir. Paris 1866.
- Perroncito, C., und Maggiora, A., (1) Studien über bitteren Rotwein. (Referat i. Weinlaube. 1888. p. 459; Originalarb. in La settimana vinic. Bd. 9. 1888.)
- Ripper, M., (1) Der Karster „Terrano“. Görz (Selbstverlag des Verf.) 1910.
- Rosenstiehl, A., (1) Du rôle de la fermentation de l'acide malique dans la vinification. (Rev. de vitic. 1908. T. 29. p. 514.)
- Schander, R., (1) Über Schwefelwasserstoffbildung durch Hefe. (Jahresber. d. Verein. d. Vertret. d. angewandten Botan. Jahrg. 2. 1903/04. p. 85.)
- Schukow, J., (1) Über den Säureverbrauch der Hefen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 2. p. 601; Ber. d. Lehranst. Geisenheim 1897. p. 176.)
- Schultz, (1) Über das Umschlagen der Rotweine. (Weinlaube IX. 1877. p. 303.)
- Seifert, W., (1) Über die Säureabnahme im Wein und den dabei sich vollziehenden Gärungsprozeß. (Mitt. a. d. gärungsphysiol. Lab. Klosterneuburg. 1901.)
- (2) Über die Säureabnahme im Wein und den dabei stattfindenden Gärungsprozeß. II. (Zeitschr. f. d. landw. Versuchsw. in Österreich. Bd. 6. 1903. p. 567; K. J. 1903. p. 254.)
- (3) Über die Vergärung der Zitronensäure als Ursache einer Erkrankung des Johannisbeerweines. (Zeitschr. f. d. landw. Versuchsw. in Österr. 1903. p. 738; Weinlaube. 1903. p. 482.)
- (4) Fehler und Krankheiten des Weines, für welche im neuen Weingesetze besondere Verfahrensarten vorgesehen sind. Vortrag. (Separatabdr. d. Mitt. d. Ver. z. Schutze d. österr. Weinb. an seine Mitglieder. No. 132. 1908.)
- Seifert, W., und Haid, R., (1) Über die Einwirkung der Milchsäurebakterien auf den Wein. (Zeitschr. f. d. landw. Versuchsw. in Österr. 1909. p. 681.)
- Sémichon, L., (1) Traité des maladies des vins. Montpellier 1905.
- Trillat, A., (1) Sur la maladie de l'amertume des vins. (Compt. rend. T. 143. 1906. p. 1244; Kochs Jahresber. Jahrg. 17. 1906. p. 276.)
- Voisenet, E., (1) (Comp. rend. T. 150. 1910. p. 1614 und T. 151. p. 518.)
- Weigmann, H., (1) Abschnitt Milchsäuregärung und Biologie der Milchsäurebakterien. (Lafar Handb. d. techn. Mykol. Jena 1905—1908. Bd. 2. p. 48. und 87.)
- Wortmann, Julius, (1) Untersuchungen über das Auftreten und Verhalten von *Dematium pullulans* im gärenden Most. (Jahresber. d. Lehranst. Geisenheim f. 1891/92. p. 52.)
- (2) Untersuchungen über reine Hefen. II. (Landw. Jahrb. 1894. p. 535.)
- (3) Untersuchungen über das Umschlagen der Weine. (Weinbau und Weinhand. 1899. p. 294. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 6. 1900. p. 298.)
- (4) Untersuchungen über das Bitterwerden der Rotweine. (Landw. Jahrb. 1900. p. 629.)

Tafelerklärung.

Tafel I.

Fig. 1. Reinkultur von *Bacterium mannitolpæum* t in mit etwas Traubensaft versetzten Weißwein (aus Gutedel-Trauben). Vergr. 1200 : 1.

Fig. 2. *Bacterium mannitolpæum* t aus einer Tiefenkolonie in Nährgelatine. Vergr. 1200 : 1.

Fig. 3. Reinkultur von *Bact. mannitolpæum* p in mit etwas Traubensaft versetzten Weißwein (aus Gutedel-Trauben). Vergr. 1200 : 1.

Fig. 4. Reinkultur von *Bacterium gracile* g in mit etwas Traubensaft versetzten Weißwein (aus Gutedel-Trauben). Vergr. 1200 : 1.

Fig. 5. Reinkultur von *Bact. gracile* g in einem teilweise entsäuerten Schellerbirnwein. Vergr. 1200 : 1.

Fig. 6. Reinkultur von *Micrococcus acidovorax* in mit etwas Traubensaft versetzten Weißwein (aus Gutedel-Trauben). Vergr. 1200 : 1.

Fig. 7. Reinkultur von *Micrococcus variococcus* h in mit etwas Traubensaft versetzten Weißwein (aus Gutedel-Trauben). Vergr. 1200 : 1.

Fig. 8. Reinkultur von *Micrococcus variococcus* n in mit etwas Traubensaft versetzten Weißwein (aus Gutedel-Trauben). Vergr. 1200 : 1.

Tafel II.

Fig. 9. *Bacterium mannitolpæum* t, 26 Tage alte Oberflächenkolonie auf Nährgelatine. Vergr. 15 : 1.

Fig. 10. *Bacterium gracile* g, 26 Tage alt, Oberflächenkolonie auf Nährgelatine. Vergr. 50 : 1.

Fig. 11. *Micrococcus acidovorax*, 26 Tage alte Oberflächenkolonie auf Nährgelatine. Vergr. 50 : 1.

Fig. 12. *Bacterium mannitolpæum* t, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 13. *Bacterium mannitolpæum* f, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 14. *Bacterium mannitolpæum* k, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 15. *Bacterium mannitolpæum* p, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 16. *Bacterium gracile* g, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 17. *Bacterium gracile* s, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 18. *Bacterium gracile* a, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 19. *Micrococcus variococcus* h, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 20. *Micrococcus acidovorax*, 67 Tage alte Riesenkolonie auf Nährgelatine. Natürl. Gr.

Fig. 21. *Bacterium mannitolpæum* t, 26 Tage alte Tiefenkolonie in Nährgelatine. Vergr. 40 : 1.

Fig. 22. *Bacterium mannitolpæum* t, 26 Tage alte Tiefenkolonie in Nährgelatine. Vergr. 15 : 1.

Fig. 23. *Bacterium mannitolpæum* t, 26 Tage alte Tiefenkolonie aus einer Nährgelatine Kultur mit zahlreichen Kolonien. Vergr. 50 : 1.

Fig. 24. *Bacterium gracile* g, 26 Tage alte Tiefenkolonie in Nährgelatine. Vergr. 50 : 1.

Fig. 25. *Micrococcus variococcus* h, 26 Tage alte Tiefenkolonie in Nährgelatine. Vergr. 15 : 1.

Fig. 26. *Micrococcus acidovorax*, 26 Tage alte Tiefenkolonie in Nährgelatine. Vergr. 50 : 1.

Tafel III.

Fig. 27. Bakterien aus einem „umgeschlagenen“ Rotwein, der die Erscheinung des „Versiedens“ zeigte (Schaffhauser). Vergr. 1200 : 1.

Fig. 28. Bakterien aus einem „umgeschlagenen“ Rotwein, der die Erscheinung des „Versiedens“ zeigte (Mayenfelder). Vergr. 1200 : 1.

Fig. 29. Milchsäurebakterien aus einer großen Flocke in einem Fischbächlerbirnwein. Ein Teil der Bakterien (links) ist noch fadenförmig, lang gegliedert, ein anderer Teil (rechts) im Beginn der Zoogloeebildung, kurz gegliedert, zusammengeknäult. Vergr. 150 : 1.

Fig. 30. Gruppe von größeren und kleineren Zoogloeen von Milchsäurebakterien aus einem Sürler- und Ottenbacher-Schellerbirnwein. Vergr. 350 : 1.

Fig. 31. Kleine Blase aus Fischbächlerbirnwein mit regelmäßiger Anordnung der Milchsäurebakterien. Vergr. 400 : 1.

Fig. 32. Zwei Blasen mit Milchsäurebakterien aus Fischbächlerwein; unter den beiden eine zusammengesunkene entleerte Blase. Vergr. 300 : 1.

Fig. 33. Große und damit zusammenhängende kleinere Blasen mit Milchsäurebakterien aus Reinholzbirnwein. Von der Seite photographiert, um die zusammengesunkene Bakterienmasse zu zeigen. Vergr. 30 : 1.

Fig. 34. Zwei Gärfaschen mit Birnwein. In der einen (rechts) haben sich auf dem Hefedepot große Flocken aus Milchsäurebakterien (*Bact. mannitopœum*) gebildet; in der andern (links) sind auf dem Hefedepot ebenfalls Milchsäurebakterienflocken sichtbar; daneben aber sind solche auch an der Glaswand entstanden (Vorderseite der Flasche links). Vergr. 1 : 3.

Inhaltsübersicht.

	Seite
Einleitung	129
Kapitel I.	
Die bisherigen Kenntnisse von den durch Bakterien im Wein verursachten Veränderungen	129
1. Das Vorkommen von Bakterien im Wein	131
2. Die durch diese Bakterien verursachten Veränderungen	132
Der Milchsäurestich. Die Mannitgärung. Das Zäh- oder Lindwerden.	
Der Bockser. Das Umschlagen (<i>la tourne et la pousse</i>). Das Mäuseln.	
Das Bitterwerden. Der Buttersäurestich. Der Säureabbau	133-153
Kapitel II.	
Reinsüchtung und Kultur von Weinbakterien	154
Kapitel III.	
Untersuchungen über 4 von uns reingezüchtete Weinbakterienarten. Morphologie, Physiologie und Systematik	156
I. Gruppe des <i>Bacterium mannitopœum</i>	157
A. Morphologisches Verhalten	157
B. Physiologisches Verhalten	161
1. Gegenüber den Hexosen: Dextrose, Lävulose, und Galaktose	162
2. In Lösungen von Saccharose, Laktose, Maltose und Raffinose	167
3. Gegenüber den Pentosen: l-Arabinose, Xylose und Rhamnose (Isodulcit)	171
4. Gegenüber den Glukosiden: α -Methylglukosid, Amygdalin und Phloridzin	173
5. Gegenüber Mannit, Dextrin und Pepton Witte	175
6. Gegenüber Äpfelsäure und äpfelsauren Salzen	176
7. Gegenüber der Weinsäure und weinsauren Salzen	179
8. Gegenüber Bernsteinsäure, Zitronensäure und Milchsäure	180
9. Gegenüber verschiedenen Alkohol- und Säuremengen	182
10. Einfluß der Temperatur auf die Gärthätigkeit des <i>Bact. mannitopœum</i>	185
11. Einfluß des Sauerstoffzutrittes auf das <i>Bact. mannitopœum</i>	186
12. <i>Bact. mannitopœum</i> in unvergorenen Obst- und Traubensäften.	188
13. Gegenseitige Beeinflussung von <i>Bact. mannitopœum</i> und Hefe	194
14. <i>Bact. mannitopœum</i> in Trauben- und Obstweinen.	196
II. Gruppe des <i>Bacterium gracile</i>	202
A. Morphologisches Verhalten	202
Zweite Abt. Bd. 36.	22

B. Physiologisches Verhalten	205
1. Gegenüber den Hexosen: Dextrose, Lävulose und Galaktose	205
2. In Lösungen von Saccharose, Laktose, Maltose und Raffinose	207
3. Gegenüber den Pentosen: l-Arabinose, Xylose und Rhamnose (Isodulcit)	207
4. Gegenüber den Glukosiden: α -Methylglukosid, Amygdalin und Phloridzin	208
5. In Lösungen von Mannit, Dextrin und Pepton Witte	209
6. Gegenüber Äpfelsäure und äpfelsauren Salzen	209
7. Gegenüber Weinsäure und weinsauren Salzen	212
8. In Lösungen von Bernsteinsäure, Zitronensäure und Milchsäure	214
9. Gegenüber verschiedenen Alkohol- und Säuremengen	215
10. Einfluß der Temperatur auf die Gärbarkeit des <i>Bact. gracile</i>	218
11. Einfluß des Sauerstoffzutritts auf <i>Bact. gracile</i>	219
12. <i>Bact. gracile</i> in unvergorenen Obst- und Traubensäften	220
13. Gegenseitige Beeinflussung von <i>Bact. gracile</i> und Hefe	223
14. <i>Bact. gracile</i> in Obst- und Traubenweinen	229
III. Micrococcus-Gruppe	236
A. Morphologisches Verhalten	236
B. Physiologisches Verhalten von <i>Micr. acidovorax</i> und <i>Micr. variococcus</i>	240
1. Gegenüber den Hexosen: Dextrose, Lävulose und Galaktose	241
2. Gegenüber Saccharose, Laktose, Maltose und Raffinose	243
3. Gegenüber den Pentosen: l-Arabinose, Xylose und Rhamnose (Isodulcit)	245
4. Gegenüber den Glukosiden: α -Methylglukosid, Amygdalin und Phloridzin	246
5. In Lösungen von Mannit, Dextrin und Pepton Witte	248
6. Gegenüber Äpfelsäure und äpfelsauren Salzen	248
7. Gegenüber Weinsäure und weinsauren Salzen	253
8. In Lösungen von Bernsteinsäure, Zitronensäure und Milchsäure	255
9. Gegenüber verschiedenen Alkohol- und Säuremengen	255
10. Einfluß der Temperatur auf die Gärbarkeit des <i>Micr. acidovorax</i> und <i>Micr. variococcus</i>	258
11. Einfluß des Sauerstoffzutritts	260
12. <i>Micr. acidovorax</i> und <i>Micr. variococcus</i> in unvergorenen Obst- und Traubensäften	260
13. Gegenseitige Beeinflussung der Mikrokokken und der Hefe	263
14. <i>Micr. acidovorax</i> und <i>Micr. variococcus</i> in Weinen und Obstweinen	266
IV. Diagnose und systematische Stellung der untersuchten 4 Bakterien-Arten	275
Kapitel IV.	
Die durch Bakterien verursachten Veränderungen im Wein, beurteilt auf Grund der mit Reinkulturen gewonnenen Ergebnisse	287
1. Der Säureabbau	288
2. Milchsäurestich und Mannitgärung	305
3. Der Mäuselgeschmack	323
4. Das Umschlagen der Weine	324
Kapitel V.	
Anwendung der gewonnenen Versuchsergebnisse bei der Beurteilung von Weinen	327
Literatur	333
Erklärung der Tafeln	336

Nachdruck verboten.

Über thermophile Zellulosevergärer.

Vorläufige Mitteilung.

[Aus dem bakteriologischen Institute der k. k. böhm. technisch. Hochschule zu Prag. Vorstand: Prof. Dr. A. Velich.]

Von Ing. Alois Kroulik,

Assistent am Institute.

Der spärlichen über thermophile, zellulosezersetzende Mikroorganismen berichtenden Literatur entnehme ich bloß zwei Arbeiten, und zwar diejenigen von MacFadyen and Blaxall¹⁾ und von H. Pringsheim²⁾.

MacFadyen and Blaxall sind die ersten, welche über gelungene Versuche mit thermophiler Zellulosezersetzung berichten. Ihre Nährlösung enthielt die Zellulose einerseits in Nägeli's Nährmedium mit 5 ccm Bouillon, andererseits in bloßer Bouillon. Eine kleine Menge Bouillon soll die Zersetzung begünstigt haben. Die Autoren haben die betreffenden Mikroorganismen bei 60° C gezüchtet, außerdem aber auch bei 22 und 37° C, in letztgenannten Fällen jedoch erfolglos. Es wurde bei den Versuchen teils völlig reine Zellulose, teils Filtrierpapier und Esparto-Zellulose benützt. Alle diese Kulturen haben Zellulose vergärt; die Versuche wurden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen angestellt. In den anaeroben Reagensgläsern war die Zersetzung fortgeschrittener. Die Nährlösungen wurden mit Erde geimpft und es machen die Autoren auf eine mögliche Bedeutung von Bodenbestandteilen aufmerksam. Die Fermentation wurde immer nur mit einem Bakteriengemische erzielt und nach der Meinung der Autoren ist dieselbe symbiotischer Natur. Als Resultat der von Cross durchgeführten Untersuchungen erwähnen die Autoren bezüglich der Zersetzungsprodukte: 1. keine Reduktion von CuO, auch nicht nach Kochen mit Säure; 2. kein anderer Beweis von irgendwelchen Zersetzungsprodukten; 3. bei der Destillation bieten 25 ccm der vergärten Flüssigkeit flüchtige Säuren, welche 1 ccm normalen NaOH entsprechen — Essig- und Buttersäure. Der Rest brachte bei der Destillation mit HCl Spuren von Furfurol zum Vorschein. Die Gase wurden nicht analysiert, — die Autoren meinen bloß, daß etwa CO₂ und CH₄ zur Bildung gelangen. Bestimmte Bakterienarten werden nicht angeführt.

H. Pringsheim gelang es aber, besonders bei der thermophilen Zellulosezersetzung, aber ebenso auch bei den übrigen Arten der Zellulosevergärung, die Wirkung von zwei hydrolytischen Enzymen, und zwar: der Zellulase und der Zellobiase — auf Grund der Bestimmung der vorübergehend entstehenden Zuckerarten: Glukose und Zellobiose nachzuweisen.

Auf Veranlassung meines Chefs, Prof. Dr. A. Velich, unternahm ich im Oktober 1911 die Bearbeitung der Frage der thermophilen Zellulosezersetzung. Die ursprünglichen, schon seit Anfang des Jahres 1911 im hiesigen Institute angestellten Versuche, wurden in folgender von Prof. Velich angegebenen Weise ausgeführt: Es wurden gewöhnliche Petri-Schalen mit einem Zinkring versehen, die mittlere Partie mit Erde gefüllt und in die Rinne zwischen den Rändern der Schale und dem Zinkring steriles Wasser eingegossen, sodann auf die Oberfläche der Erdschicht sterile Papierstreifen gelegt und das Ganze im Thermostat bei 60—65° C. aufgestellt. Ich selbst benutzte bei meinen Versuchen anfänglich auch diese Methode, doch verwendete ich auch statt eines Zinkringes einen solchen von Aluminium, und als Impfmateriel verschiedene Humusproben, Schlamm, Mist und frische Exkremente von Wiederkäuern, kurz Proben von den Stellen, wo die Zellulose der natürlichen Zersetzung anheimfällt. Es hat sich gezeigt, daß, je

¹⁾ MacFadyen and Blaxall, Transact. of the Jenner Instit. of Prevent. Med. 2. Ser. 1899. p. 182.

²⁾ Pringsheim, H., Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78. 1912. p. 288; Refer. in Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 35. 1902. p. 308.

größere Mengen von Humus resp. des Zellulosematerials die Probe enthielt, desto früher das Papier unter den angegebenen Bedingungen der Fermentation unterlag. Besonders die der Bodenprobe anliegende Seite enthielt massenhaft Bakterien — dünne Bazillen mit endständigen Sporen. Später erschienen, besonders in den humus- resp. zellulosereichen Proben gelbliche bis braune Flecke und das Papier verlor mit fortschreitender Zersetzung allmählich seine Konsistenz. In keinem Falle benutzte ich dieses Mikrobenmaterial zur Erzielung einer Reinkultur, sondern arbeitete weiterhin mit flüssigen Nährmedien, bei denen man die Wachstumsbedingungen nach Belieben ändern kann. Die ersten Versuche wurden mit 10-proz. Bodendekokt angestellt, doch erwies sich dasselbe als ein wenig zweckmäßiges Nährmedium.

Ich beschränkte mich deshalb bei den eigentlichen Versuchen auf ein künstlich zusammengesetztes Nährmedium, in der Überzeugung, daß nur in dem Falle, in welchem wir die Bestandteile des Nährmediums genau kennen, es auch möglich ist, alle seine Änderungen chemisch zu verfolgen. Das war auch der Grund, warum ich gleich am Anfange meiner Versuche die Benutzung der Bouillon eliminiert habe, obwohl man sich derselben bisher noch immer bedient hat (siehe MacFadyen and Blaxall und H. Pringsheim).

Die flüssige Nährlösung hatte eine ähnliche Zusammensetzung, wie die Lösung Omelianskis : 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , Spur NaCl , 1000 ccm destilliertes Wasser, 1—2 Proz. Zellulose und 0,5—1 Proz. Ca CO_3 resp. Mg CO_3 . Später, nachdem ich den schädlichen Einfluß einer übermäßigen Menge von Sulfaten erkannt habe, benutzte ich in rein mineralischen Nährlösungen ausschließlich $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$. In Nährlösungen mit organischem Stickstoffmaterial wurde es gewöhnlich durch 0,5—1 g Asparagin ersetzt. Außer diesen üblichen Nährlösungen wurde die Assimilation resp. der Einfluß auch von anderen Substanzen geprüft, wovon jedoch später noch die Rede sein wird.

Die ersten Versuche hatten den Zweck, eine Übersicht der Verbreitung der „Zellulosemikroben“ in der Natur zu liefern. Es wurden daher die beiden angeführten Lösungen, teils mit kleinerer, teils mit größerer Menge der diversen Proben beimpft. Als Impfmateriel wurde gewählt: Erde aus dem Garten unseres Instituts, Ackererde aus seichteren und tieferen Bodenpartien, besonders einige Bodenproben aus Rübenfeldern, frische Pferdefaeces, weniger und mehr gerotteter Stallmist, Kompostboden, Mistbeetboden, Wiesen- und Sandboden, Boden aus einem Laub- und Nadelwald, ältere Fäkalien, Leitungswasser, Schlamm und Straßenstaub. Mit diesen Proben wurden die sterilen Nährlösungen in breiteren Reagensgläsern geimpft; dabei habe ich auch den Einfluß der Lüftung (des Sauerstoffs) nicht außer Acht gelassen — es wurde sowohl unter Aërobiose als auch Anaërobiose kultiviert. Bei der Anaërobiose schloß ich den Einfluß des Kautschuks durch die Benützung eines geschliffenen Glasstopfens aus, wobei die Nährlösung die ganze Eprouvete ausfüllte. In der Mehrzahl der Fälle kam in mehr weniger kurzer Zeit eine deutliche Zersetzung des Filtrierpapiers zustande — die Zersetzung war der natürlichen Fähigkeit der benutzten Impfproben zur Zellulosezersetzung angemessen. Bloß in einem Falle — nämlich bei Benutzung von Abortfäkalien und von Abwasser als Impfmaterielien traten nicht einmal nach 14 Tagen die zu erwartenden Merkmale der Zersetzung ein. Am intensivsten war die Zersetzung bei Impfung mit Stallmist, Fäkalien, Erde aus Mistbeeten und Kompost,

Rübenboden und Schlamm; — bereits nach $1\frac{1}{2}$, 2—3 Tagen begann die Zersetzung und erreichte in kurzer Zeit ihr Maximum. Bei Anaërobiose begann die Zersetzung gewöhnlich später — nach 3—4 Tagen, und schritt auch langsamer fort, doch war die Vergärung wieder vollkommener; der Einfluß einer größeren Menge der Lösung und anderen Bakterienmaterials war also bei der anaërobiotischen Vergärung merklich.

Einzelne Proben wurden der mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurde in allen Fällen ein Bakteriengemisch vorgefunden. Um zu entscheiden, welche Bakterien die Zersetzung der typischen Zellulose verursachen, bzw. wenigstens sich an ihr beteiligen, wurde in dieselben frischen flüssigen Nährmedien anorganischer bzw. organischer Stickstoff überimpft. Nach 2, 3—4 Tagen fanden die ersten Zeichen der beginnenden Zellulosezersetzung statt. Der normale Gang wird noch später beschrieben werden. Ich mache gleich hier darauf aufmerksam, daß es notwendig ist — besonders bei der Überimpfung in rein mineralische Nährlösung — eine größere Menge der alten Kultur zu benutzen. Die vergärten Proben wurden ebenfalls einzeln der mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Ich fand ein Gemisch von Bakterien vor, und zwar vegetative Formen und Sporen; die Bakterien waren sowohl in einer und derselben, als auch in verschiedenen Proben sehr verschieden, obwohl hier und da auch eine und dieselbe Art resp. Form vorherrschte. Aus den bereits vergärten Proben war es wiederholt möglich, in frische, auch rein mineralische Nährlösungen Impfungen auszuführen. Auch nach 3- und 4-maligem Überimpfen einiger schneller vergärenden Proben wurde die thermophile Fermentation von Filtrierpapier erzielt, obwohl ich bemerken muß, daß die Intensität der Zersetzung mit der mehrmaligen Überimpfung abnimmt und mit derjenigen bei der ersten Beimpfung mit Boden oder Mist nicht zu vergleichen ist. Die Gärung findet in den Eprouvetten, besonders in rein mineralischen Nährlösungen erst später statt und das Material wird auch nicht vollkommen vergärt, manchmal versagt sie völlig, oder hört bald auf. Die Ursache ist natürlich in einer unvollkommenen Zusammensetzung der flüssigen Nährmedien, bedingt durch Abwesenheit der sonst mit dem Boden oder Mist zugeführten nötigen organischen und anorganischen Substanzen, zu suchen. Trotzdem kann man, wie oben angeführt wurde, Überimpfungen ausführen, und zwar leichter im Nährmedium mit organischem Stickstoff, schwieriger in jenem mit anorganischem Stickstoff. Der Bedarf von organischem Stickstoff schien besonders in anaëroben Proben evidenter zu sein, da in denselben die Überimpfung noch schwieriger gelang.

Auch wurde der Inhalt des Duodenums und Rektums der Wiederkäuer auf seine Fähigkeit der Zellulosezersetzung geprüft, und auch hier wurde, sowohl bei Aërobiose als auch bei Anaërobiose die Papierzersetzung nachgewiesen. Weitere darauf bezügliche Versuche werden später zur Veröffentlichung gelangen.

Résumé.

Die Mikroorganismen (Bakterien und auch Aktinomyceten-ähnliche Organismen), welche die typische Zellulose auch bei hoher Temperatur, 60—65° C., zersetzen, sind in der Natur sehr verbreitet und kommen besonders dort vor, wo die Zellulosen der natürlichen Zersetzung anheimfallen.

In keiner Probe verfolgte ich die Zellulosezersetzung weiter, sondern beschränkte mich weiterhin bloß auf die durch mehrmalige Überimpfung

in die angeführten, ursprünglich mit Rübenboden beimpften Lösungen erzielte Kultur der thermophilen Zellulosemikroben. Dieselbe erwies sich als ein Gemisch von Bazillen und einigen besonderen Formen, die alle als eigentliche Zellulose vergärende Organismen erkannt wurden. Ein gleiches oder wenigstens ähnliches Gemisch der beiden Arten wurde auch in der Mehrzahl der übrigen, mit verschiedenen Bodenproben geimpften Eprouvetten vorgefunden; dagegen herrschen in den mit Mist geimpften Eprouvetten die Bazillen vor. In den unter Anaërobie gezüchteten Mikroben wurde zwar auch ein Bakteriengemisch gefunden, doch mit gewissen, später anzuführenden Unterschieden in den Gärungserregern. In der vorliegenden Arbeit erwähne ich bloß diejenigen Zellulosemikroben, welche besonders in morphologischer Beziehung Interessantes bieten.

Der Vorgang der Zellulosezersetzung bei 60—65° C. scheint makroskopisch in aëroben Proben folgendermaßen fortzuschreiten: 2—3 Tage nach der Impfung erscheinen auf den Papierstreifen gelbe Flecke, besonders auf der Stelle, wo die Zellulose in das Calciumkarbonat reicht, später wird der ganze Papierstreifen gelb und gleichzeitig erscheint auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein Ring, bestehend aus den ersten Gärblasen. Darauf schreitet die Zersetzung sehr schnell fort. Im Laufe von 12—18 Stunden erscheinen auf dem gelben Papier Blasen, in welchen das Papier bald darauf löchrig wird, die Lösung wird stark trübe, der Schaum ist intensiver, und nach weiteren 12 Stunden verwandelt sich das Papier in eine gelbe zusammenfließende Masse, welche sich leicht durch Schütteln in der Flüssigkeit auseinanderbringen läßt. Weiterhin läßt aber die Zersetzung nach und in der kleinen Menge der Flüssigkeit verschwindet langsam der Papierbrei unter beständiger Gasentwicklung. Mikroskopisch erscheint die Zersetzung folgendermaßen: Im ersten Stadium erscheinen in der Flüssigkeit vegetative Formen echter Begleit-Bazillen, die ich als „Gruppe I“ bezeichne. Aus dieser wurden auf dem gewöhnlichen Fleischagar 2 Arten isoliert, wogegen durch mikroskopische Untersuchung der gelben Flecke auf dem Papier besondere Mikroorganismen gefunden wurden, die ich noch erwähnen will. Später, im weiteren Zersetzungsstadium wurde nachgewiesen, daß auch diese Mikroben ein Gemisch von mehreren Arten vorstellen, und ich bezeichne sie alle als Gruppe II. Endlich ist es im Maximum der Gärung und in den weiteren Stadien überhaupt sehr schwer zu entscheiden, ob man irgend welche Mitwirkung von Bakterien voraussetzen kann oder nicht.

Die anaërobe Papierzersetzung scheint aber auf eine andere Weise stattzufinden: Erst nach 3—5 Tagen erscheinen die ersten Zeichen einer Fermentation. Die Flüssigkeit wird trübe und auf dem weißbleibenden Papier erscheinen hellere Partien, manchmal auch kleine Löcher, und aus dem Gefäßboden (aus dem Papier) steigen Gasblasen auf. Nun geht die Zersetzung schneller vonstatten, das Papier verliert seine Konsistenz, wird in einen Brei umgewandelt — die Gärung erreicht ihr Maximum. Danach dauert aber die Gärung noch lange, wie aus der beständigen Gasbildung ersichtlich ist — 2½—3½ Wochen lang. Auch mikroskopisch läßt sich ein sichtbarer Unterschied konstatieren: Die Zersetzung wird bloß durch die eigentlichen „Zellulosemikroben“ aus der Gruppe II bewirkt.

Nachdem ich erkannt habe, daß sich an der thermophilen Zellulosezersetzung verschiedene Mikroben beteiligen, war ich natürlich bestrebt, die Reinkulturen derselben zu erhalten, besonders Reinkulturen der Mikroben

der Gruppe II. Über die Unfähigkeit der Bazillen aus der Gruppe I, die Zellulose zu ersetzen, überzeugte ich mich sehr leicht durch Überimpfung ihrer Kulturen vom Fleischagar in das Zellulose enthaltende Medium: In keinem Falle kam Zellulosezersetzung zustande. Da ich weiterhin erkannt habe, daß unter Anaërobiose eine praktische völlig reine Kultur wirkt, so halte ich die thermophile Zellulosezersetzung für keine symbiotische Tätigkeit von Mikroorganismen der beiden Gruppen. Es ist zwar nicht zu leugnen, daß unter Aërobiose auch die Bazillen der Gruppe I die kohlenstoffhaltigen Zwischenprodukte zu vergären vermögen, denn es existiert in einem rein mineralischen Nährmedium keine andere Kohlenstoffquelle, doch bleibt das Faktum bestehen, daß eine Reinkultur der Bazillen der Gruppe II nicht leicht zu bekommen ist. Obwohl ich mich bisher der verschiedensten üblichen, wie auch für diese Zersetzung besonders geeigneten Agarnährböden (also starrer Medien) bedient habe, so gelang es mir bisher nicht, eine Reinkultur resp. Kolonie der Bazillen der Gruppe II zu erhalten, abgesehen von den gelben Flecken auf einem genügend feuchten Papier. Auch blieben die zahlreichen übrigen verschiedene biologische Eigenschaften beider Gruppen voraussetzenden Versuche erfolglos: Ich prüfte verschiedene Desinfizientia, Azidität und erhöhte Alkaleszenz, die Unfähigkeit der Bazillen aus der Gruppe II auf dem Fleischagar und anderen s t a r r e n Nährböden zu wachsen die schwierige Assimilation des NH_4 -Stickstoffs durch die Gruppe I, die verschiedene Resistenz der Sporen beider Gruppen verschiedensten chemischen und physikalischen Faktoren gegenüber, besonders der Wärme, desgleichen die verschiedene Keimungsfähigkeit der Sporen, besonders auf einem für jedwede beider Gruppen unpassenden Nährmedien — alles ohne merklichen Erfolg. Es gelang mir bloß, wie ich schon bemerkt habe, durch Einführung der Anaërobiose bei den aërob gezüchteten Kulturen eine ziemlich vollkommene Isolation eines fakultativ-anaëroben *Bacillus* II 2 und deshalb auch eine Trennung desselben vom *Bacillus* II 1 zu erzielen. Ich gedenke an dieser Stelle der ähnlichen Schwierigkeiten *Omelianski*¹⁾, dem es nicht gelungen ist, durch elektive Methode eine Reinkultur seiner, auf starrem Medium nicht wachsenden CH_4 und H-Bazillen zu erzielen, ein Umstand, den übrigens auch die neueste Arbeit über bakterielle Zellulosezersetzung vollkommen bestätigt²⁾.

Desto ausführlicher und genauer untersuchte ich mikroskopisch die benutzte Kultur beider Gruppen und erreichte folgende Übersicht: Was die I. Gruppe anbelangt, mag es genügen, zu sagen, daß es gewöhnliche, größere oder kleinere, durch Teilung sich vermehrende und auf starren Medien früher, auf flüssigen später endständige (I 1), oder mittelständige Sporen (I 2; in diesem Falle besitzen sie die Form von Klostridien) bildende Bazillen sind. Nähere Beschreibung folgt später.

Nicht so deutlich sind die Wachstumsverhältnisse bei der Gruppe II, besonders wenn wir gezwungen sind, ein Gemisch zu untersuchen. Nichtsdestoweniger gelang es mir endlich auch hier durch zahlreiche Präparate ein klares Bild zu schaffen: *Bacillus* No. II 1 — t h e r m o p h i l e r, aërober Zellulosezer-setzer ist morphologisch sehr interessant, und soweit mir aus der Literatur bekannt ist, noch nicht beschrieben:

¹⁾ *Omelianski*, W., Über die Gärung der Zellulose. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902. p. 292, 356.)

²⁾ *Kellermann*, K., and *McBett*, The Fermentation of Cellulose. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. p. 485.)

Die große, im Präparate auffällige Ovalspre keimt in einen ziemlich starken Faden aus, der weiter wächst und sich oft einigemal umdreht, wodurch der Eindruck mehrerer parallel verlaufender Fäden erweckt wird und teilt sich auch scheinbar. Eine echte Astbildung habe ich nicht beobachtet. Darauf folgt eine charakteristische Teilung des Fadens in kürzere und längere selbständige Stücke und kleine, sehr charakteristische Fragmente. Gleichzeitig beginnen sich an den Enden (an einen oder gleichzeitig auf beiden Polen) Sporen zu bilden. Endlich sind die Sporen reif, und der Rest des Stäbchens verschwindet.

Bacillus No. II 2 — thermophiler, fakultativ anaërober Vergärer bildet kleine, runde Sporen, die in einen dünnen, langen, nicht verästelten Faden auskeimen, der sich wieder in runde endständige Sporen bildende Stäbchen teilt.

Endlich beobachtete ich eine gewisse Variabilität der Form und des Wachstums, welche durch Änderung der vegetativen Bedingungen verursacht wurde: In dem Falle, daß wir den *Bacillus* II 1 (das Wachstum ist sehr dürrig) unter Luftabschluß züchten, findet die Teilung der Fäden in einzelne Bazillen und die Sporenbildung nicht so bald statt bzw. bleibt völlig aus; auch der *Bacillus* II 2 behält in der Anaërobiose seine Fadenform weit länger, so daß man die einzelnen Stadien des Wachstums leicht konstatieren kann.

Die beiden Bazillen aus der Gruppe I kann man, wie ich schon bemerkt habe, leicht auf dem Fleischagar züchten. *Bacillus* No. I 1 bildet auf demselben hellere, durchsichtige, platte, glänzende und runde Kolonien. Er wächst in der Milch, die er nach längerer Zeit koaguliert. Auf dem Brote und der Kartoffel wächst er nicht. In der Bouillon bildet derselbe eine Haut, und wächst in derselben, sowohl auf dem Bouillonagar sogar bei 35° C., obwohl viel langsamer: Die Kolonien sind erst nach 3—4 Tagen bemerkbar, dagegen bei 60° C. schon in 18—24 Stunden. Die Sporen vertragen bei der Sterilisation den strömenden Dampf 2 Stunden lang. Der NH_4 -Stickstoff wird nicht leicht assimiliert und die Kohlehydrate (niedere Zuckerarten, wie Glukose, Saccharose usw.) werden nicht sichtbar (unter Gasbildung) vergärt.

Bacillus I 2 scheint dem erstbeschriebenen biologisch sehr ähnlich zu sein. Auf dem Fleischagar bildet derselbe kleinere gelbliche Kolonien, in der Bouillon eine dicke Haut, und zeichnet sich sowohl bei höherer als auch niederer (35° C.) Temperatur durch ein schnelleres und intensiveres Wachstum aus, als der früher besprochene *Bacillus* I 1. Die Sporen vertragen auch die Einwirkung des strömenden Dampfes 2 Stunden lang.

Was die Biologie der Bazillen der Gruppe II anbelangt, so versuchte ich, dieselbe durch Benutzung eines so einfach wie möglich zusammengesetzten Mediums zu studieren, um mir einen Einblick in die Wirkungen der verschiedenen, späterhin hinzugefügten Substanzen verschaffen zu können. Wie ich schon früher gesagt habe, geben sich die Bazillen No. II 1 und II 2 mit anorganischem Stickstoff zufrieden und es ist möglich, dieselben auch 15mal und öfter zu überimpfen, ja man kann sogar später auch mit einem kleineren Partikel der alten Kultur die Vergärung erzielen — ein Merkmal der Akkomodation! Der organische Stickstoff — Asparagin, Pepton, Bouillon — wird besser assimiliert, der Nitrastickstoff überhaupt nicht. Die beiden Bazillen II 1 und II 2 vergären niedere Zuckerarten, Hexosen und Di-

sacchariden, besonders intensiv aber die Glukose in einem sowohl mineralischen als auch organischen Stickstoff enthaltenden Medium. Bei der Untersuchung des Einflusses von verschieden reiner echter Zellulose (Filterpapier) konstatierte ich, daß vollkommen reine Zellulose, die beinahe von allen Aschenbestandteilen befreit ist, manchmal überhaupt nicht angegriffen wird. Als Ursache dieser Erscheinung wurde der Mangel an Eisen erkannt, denn nach Zufügung einer Spur eines Ferrisalzes (FeCl_3) der nicht gärenden Flüssigkeit, fand schon während 12—24 Stunden eine intensive Zersetzung statt. Eine größere Konzentration der Ferri-Salze wirkte aber schädlich. Chemisch niedergeschlagene, strukturlose und leicht diffusible Zellulose (aus dem Schweizerischen Reagens), welche aber bereits teilweise hydrolysiert ist, wurde leichter vergärt als Zellulose in Form des Filtrierpapiers. Die bei der Zersetzung entstehenden organischen Säuren stellen die weitere Zersetzung ein, wie ich mich leicht entweder durch direkte Zugabe von denselben der frischen Lösung, als auch bloß durch die Weglassung des Calciumkarbonates überzeugen konnte. Die charakteristische gelbliche Papierverfärbung wird bloß beim Sauerstoffzutritt gebildet, denn in dem Falle, daß wir der in Anaërobiose gärenden Kultur den Luftzutritt ermöglichen, wird das Papier gelb.

Was die Temperatur anbelangt, so wurde konstatiert, daß die optimale Grenze zwischen 55—60° C, die maximale bei 68° und die minimale unter 30° C liegt; bei der letztgenannten Temperatur erzielte ich auch eine, wenngleich sehr langsame Zellulosezersetzung durch die thermophilen Vergärer. Die Resistenz der Sporen des *Bacillus* II 1 ist größer als derjenigen von *Bacillus* II 2, welche eine 2stündige Einwirkung des strömenden Dampfes nicht vertragen. Die markanteste Wirkung auf die Gärung scheint doch am meisten von der Lüftung abhängig zu sein. Diese Versuche wurden auch mit der Untersuchung der Zwischen- und Endprodukte der Zersetzungen verbunden.

Es wurde dabei nachgewiesen, daß in der Aërobiose von den Gasen bloß Kohlendioxyd gebildet wird und als Endprodukte der Zersetzung wurden in der Flüssigkeit, welche erst nach vollkommener Vergärung, als keine Gasbildung mehr stattfand, geprüft wurden, gefunden: Ameisensäure, Essigsäure (über 80 Proz.), Buttersäure, außer einer geringen Menge näher nicht bestimmter sauerstoffhaltiger, flüchtiger Stoffe. Die Papiervergärung war nicht vollkommen — es blieben 30 und noch mehr Proz. unzersetzt. Maximale Gasbildung war nach 3—4 Tagen, und betrug ca. 20 ccm pro Tag. In den letzten Proben des abgezogenen Gases wurde überhaupt kein Sauerstoff nachgewiesen, im Gegenteil begann sich eine kleine Menge von Wasserstoff zu bilden.

Unter Anaërobiose entstanden als Gasprodukte Wasserstoff und Kohlendioxyd, und nebenbei manchmal auch erhebliche Mengen von Schwefelwasserstoff, der sich höchstwahrscheinlich durch die Reduktion der Sulfate mittelst Wasserstoff „in statu nascendi“ gebildet hat. Methan wurde nicht nachgewiesen. Als Endprodukte, welche wiederum erst nach vollkommener Vergärung geprüft wurden, waren nachgewiesen dieselben wie unter Aërobiose. Die Vergärung des Papiers war vollkommener — 90 Proz. und auch mehr und aus demselben Grunde auch größere Azidität der destillierten angesäuerten Flüssigkeit. Die maximale Gasbildung war nach 6—7 Tagen und betrug ca. 17 ccm pro Stunde. Das höchste Volumgehalt an Kohlendioxyd be-

trug 85 Proz., des Wasserstoffs 65 Proz. Die Azidität betrug maximal 1 ccm n-Säure für 50 ccm der vergorenen Flüssigkeit.

Weiterhin will ich nochmals versuchen, Reinkulturen der Gruppe II gleichwie auch von anderen Zellulosevergärrern zu erzielen, wie auch ihre Bedeutung im Verdauungstraktus der Wiederkäuer und bei der Zellulosevergärung in der Natur zu konstatieren. Ich behalte mir vor, die Resultate dieser Versuche in weiteren Mitteilungen vorzulegen.

Nachdruck verboten.

Vom Trocknen des Bodens.

Von Dr. Hugo Fischer.

Daß Böden infolge des Trockenwerdens wesentliche Änderungen erleiden, ist bekannt. Namentlich ist schon seit langer Zeit aufgefallen, daß der Gehalt an Salpeterstickstoff ganz beträchtlich zunimmt, während das Wasser herausdunstet.

Die Aufmerksamkeit der Bodenbakteriologen wurde hauptsächlich auf die hierauf bezüglichen Fragen gelenkt durch das Erscheinen der von O. R a h n, unter Leitung von B. H e i n z e, ausgeführten und im Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1907. p. 38 ff. veröffentlichten Untersuchungen, wonach die sogenannte „bakterielle Aktivität eines Bodens“, d. h. die in den Umsetzungsversuchen in Flüssigkeitskultur nach R e m y sich zeigenden Erscheinungen in bezug auf die Geschwindigkeit ihres Verlaufes wesentliche Änderungen erfahren, und zwar in dem Sinne, daß ein Boden um so aktiver wird, je weiter der Prozeß der Austrocknung fortschreitet. Es leuchtet ein, daß der Wert der ganzen R e m y'schen Untersuchungsmethode stark in Frage gestellt wird, wenn tatsächlich der Ausfall des Experimentes in so hohem Grade davon abhängig ist, wie viel oder wie wenig Wasser der Boden im Augenblick der Probeentnahme enthielt. Denn das Schwanken des Wassergehaltes ist ja ein durchaus natürlicher Vorgang, der Stand desselben in jedem Augenblick sowohl abhängig von der herrschenden Witterung, wie von den Eigenschaften und dem Zustand des Bodens selbst, und schließlich auch von der Natur des Untergrundes.

In neuerer Zeit hat G. A. R i t t e r¹⁾ die Versuche von R a h n wieder aufgenommen und in veränderter Form fortgeführt, die wichtigen Ergebnisse der erstgenannten Arbeit wurden dabei durchaus bestätigt gefunden. Wenn nun aber R i t t e r, um die Methode der Umsetzungsversuche in wässrigen Nährlösungen doch noch mit Erfolg ausführen zu können, vorschlägt, die Böden mindestens vier Wochen lang vorher in Gefäßen aufzubewahren und sie auf gleichem, genau bekanntem Feuchtigkeitsgrad zu erhalten, so scheint mir das, abgesehen von der recht zeitraubenden Umständlichkeit, doch einen beträchtlichen Fehler in das Experiment zu bringen, dessen Zweck ja doch ist, den gegenwärtig, d. h. zur Zeit der Probeentnahme, im Boden herrschenden bakteriellen Zustand festzustellen. Daß daran durch die Probeentnahme, durch die weitere Behandlung und längere Aufbewahrung des Bodens im Laboratorium, nichts geändert werden sollte,

¹⁾ R i t t e r, G. A., Das Trocknen der Erden. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 33. 1912. p. 116 ff.)

besonders in mikrobiologischer Beziehung, ist kaum anzunehmen; auch nicht, wo verschiedene Böden in Frage kommen, daß die so herbeigeführten Veränderungen in allen Böden von gleicher (absoluter oder relativer) Größe sein sollten. Freilich würde dieser Einwand vielleicht dadurch belanglos werden, daß, wie ich seinerzeit gezeigt habe, das meiste am zahlenmäßigen Ergebnis der Umsetzungsversuche die Böden selbst, bezw. deren chemische Bestandteile¹⁾, tun, die Bakterien das wenigste. Darum würde auch Ritters Vorschlag, die zur Aufbewahrung der Bodenmengen dienenden Gefäße zuvor zu sterilisieren, mir als nicht notwendig geboten erscheinen, weil ich es auf Grund selbst beobachteter Tatsachen nicht für wahrscheinlich halte, daß eine relativ immerhin geringe Zahl von spontan hineingelangenden Keimen das Resultat irgendwie beeinflussen würde; tritt doch die gewünschte Wirkung auch dann noch zutage, wenn man die Bodenproben sterilisiert und sie nachher mit einer Aufschwemmung beliebigen, nicht sterilisierten Bodens infiziert.

Vielleicht könnte man aber gerade alle Böden zuvor trocknen, ehe sie zu der Versuchsanstellung Verwendung finden; da, wie Ritter festgestellt hat, gerade die besseren Böden durch das Trocknen eine Steigerung der Bakterienwirkung erkennen lassen, so stünde ja dem nichts im Wege, abgesehen von den Nitrifikationsversuchen, da lufttrockner Boden nach den bisherigen Erfahrungen keine lebenden Nitrobakterien mehr enthält. Dem könnte aber vielleicht in der Weise abgeholfen werden, daß man den Boden doch trocknet und dann wieder mit einer Aufschwemmung feuchten Bodens die Kultur beimpft; da gerade die Nitrobakterien von langsamer Vermehrungsfähigkeit sind, dürfte es hier sogar wirklich darauf ankommen, daß man diese Aufschwemmung auch von dem zu untersuchenden Boden herstellt. Die Mikroorganismen der Fäulnis, der Zuckervergärung, der Denitrifikation, ferner *Azotobacter* und *Amylobacter* überstehen die Trocknung ausgezeichnet.

Nicht näher eingehen will ich hier auf die Frage, ob sich die ganze Methode überhaupt zu einer Wertbeurteilung des Bodens eignet; Ritter scheint dafür zu sein, wogegen sowohl Remy wie auch Löhnis (vgl. Thiels Landwirtsch. Jahrb. Bd. 42. 1912. p. 760, oben) entgegengesetzter Meinung sind, wenn ich sie recht verstanden habe.

Nur kurz berühren möchte ich, daß J. Vogel-Bromberg tatsächlich eine proportionale Beziehung zwischen Bodenfruchtbarkeit und der Geschwindigkeit der Nitrifikation organisch gebundenen Stickstoffs (Hornmehl) in vielen Fällen nachgewiesen hat, allerdings auch Ausnahmen gefunden hat, die darin bestehen, daß nährstoffarme, und an Humus mäßig reiche Böden besser nitrifizieren als ihrer Ertragsfähigkeit entspricht. Obige Beziehung zwischen Fruchtbarkeit und Nitrifikationsenergie (welche übrigens in dieser Weise nur im Boden selbst verfolgt werden kann, weil Hornmehl u. dgl. in Wasser fault und diese Fäulnis die Nitrobakterien abtötet) kann übrigens nicht wundernehmen, weil so ziemlich alle die Faktoren, welche das Wachstum der grünen Pflanze fördern, auch der Entwicklung der Salpeterbildner günstig bzw. unentbehrlich sind: Phosphor, Kali, selbstredend Stickstoff, ein mäßiger Gehalt an Kalk und Humus, gute Durchlüftungs- und Feuchtigkeitsverhältnisse — was braucht der Acker mehr, um reichlich

¹⁾ Die physikalischen Eigenschaften werden ja ausgeschaltet, wenn man den Boden mit der mehrfachen Menge Flüssigkeit aufschwemmt.

Ernte zu tragen, außer etwa noch die nötige Menge von Wärme und Licht?

Kehren wir zu den Feststellungen von Rahn und Ritter zurück, so interessiert den Forscher dabei wohl in erster Linie die eine Frage: Wie hängen die Erscheinungen hier zusammen? Wie kommt es, daß der Wasserverlust die nachher zutage tretende „Aktivität“ so wesentlich erhöht? Die Frage hat sich ja auch Ritter vorgelegt, ohne jedoch zu einer befriedigenden Antwort gelangen zu können.

Man könnte nun die Lösung des Rätsels in biologischen Verhältnissen suchen: daß mit steigendem Luftzutritt, solange aber noch Wasser in ausreichender Menge vorhanden ist, eine Bakterienvermehrung stattfindet — dem widersprechen die Keimzählungen, die im getrockneten Boden kleinere Ziffern geben als im feuchten oder halbtrockenen; auch soll es ja auf die Zahl der wirksamen Mikroorganismen eben nicht ankommen. Oder man könnte denken, daß der Wasserverlust die Bakterien zur Sporenbildung anregt, daß aber dieser an Sporen reichere Boden die stärkere Umsetzung in der Nährlösung hervorruft, weil die Sporen das Übertragen in letztere leichter ertragen, als die vegetativen Zellen, die dabei, wegen Turgescenzänderungen, in großer Zahl zugrunde gehen; damit steht aber die Tatsache in Widerspruch, daß die Steigerung der Wirkung, nach übereinstimmenden Beobachtungen von Rahn und Ritter, sehr frühzeitig einzutreten pflegt, was zu der Sporenhypothese nicht recht passen will. Auch die „Auslese“-Theorie will mir hier nicht recht wahrscheinlich dünken, einmal, weil die hauptsächliche Auslese ja erst einsetzt, wenn die Bodenproben in die Nährlösungen eingetragen werden, sodann aber ganz besonders darum, weil nach meiner auf Beobachtung beruhenden Überzeugung die Bakterien selbst das Wenigste an den zutage tretenden Unterschieden bewirken, letztere vielmehr ganz oder größtenteils auf den chemischen Eigenschaften der Böden beruhen, wie ja schon oben betont.

So scheint mir z. Z. kein biologischer Weg gangbar, der zu einer Erklärung der Erscheinungen führen könnte. Vielleicht liegt aber die gesuchte Erklärung auf rein chemischem Gebiet, was die erste Ursache angeht. Ich glaube die Lösung gefunden zu haben, und was mich dazu geführt hat, das war die bekannte Tatsache, die schon eingangs Erwähnung fand: daß mit abnehmender Feuchtigkeit der Gehalt des Bodens an Salpetersickstoff zunimmt, d. h. daß Oxydationsvorgänge in dem austrocknenden Boden stattfinden müssen. Bezüglich der Nitrifikation ist es ja nun recht interessant zu betonen, daß gerade die Nitrobakterien — als wohl die einzigen unter den bisher genauer studierten Bodenmikroben — kein Austrocknen vertragen, auch keine Sporen oder sonstige Dauerzustände zu bilden scheinen; wenn wir nun trotzdem in dem sein Wasser allmählich abgebenden Boden die Nitrifikation weiter fortschreiten sehen, so dürfen wir annehmen, daß zwar die lebenden Zellen bei der Austrocknung allmählich eingehen, daß aber Enzyme, Oxydasen der Nitrobakterien, noch weiterhin tätig bleiben.

Nun würde allein schon mit einer an Nitraten reicheren (weil getrockneten) Bodenprobe mehr Sauerstoff in die Remysche Kultur gebracht werden; wir dürfen aber vielleicht nicht ohne Grund annehmen, daß, während das Wasser verdunstet und dafür Luft in die Poren des Bodens eintritt, noch andere Oxydationen stattfinden, durch welche Verbindungen entstehen, deren Sauerstoff, wie der der Salpetersalze, für die Bak-

terien leicht abspaltbar ist¹⁾. In den Wasserkulturen muß ja, wenn sie nicht gerade in s e h r flacher Schicht angelegt werden, der Sauerstoff sehr bald knapp werden. Von den Vorgängen nun, die man in solchen Flüssigkeitskulturen verfolgt hat, ist ja die Nitrifikation ganz selbstverständlich, ferner auch die Entwicklung des Azotobacter vom Sauerstoff direkt abhängig, auch die Harnstoffbakterien sind größtenteils sauerstoffbedürftig. An Eiweißfäulnis, Säurebildung und Denitrifikation sind aber fast nur solche Bakterien beteiligt, die zwar unter Luftabschluß leben und gären können, die aber für einigen Sauerstoff, namentlich gebundenen, leicht abspaltbaren, entschieden dankbar sind; die Entwicklung wird bei einigen vielleicht durch vollen Luftzutritt gestört, durch geringere Mengen aber, namentlich eben gebundenen Sauerstoffes, entschieden gefördert; die Denitrifikation ist ja geradezu nichts anderes als die Ausnützung gebundenen Sauerstoffes.

Durch unsere Annahme also, daß mit der getrockneten Bodenmenge sauerstoffreichere Verbindungen in die Nährflüssigkeit gebracht werden, als mit der nicht getrockneten Probe, daß also dadurch für die Bakterien günstigere Vermehrungsbedingungen geschaffen würden, ließen sich die Beobachtungen von R a h n und von R i t t e r recht gut erklären; namentlich würde auch die Tatsache, daß die Förderung auf seiten der getrockneten Probe sich schon zu Anfang deutlich zeigt, mit dieser Vermutung sehr wohl übereinstimmen, denn der so eingeführte Sauerstoff wird ja naturgemäß ziemlich bald verbraucht sein, dann setzt die anaerobe Vermehrung ein, die langsamer fortschreiten muß als die aerobe, weil die Gärung eine schwächere Energiequelle ist als die Atmung.

Die Feststellung von R i t t e r, daß bessere Böden größere Unterschiede zwischen dem Verhalten getrockneter und nicht getrockneter Proben zutage treten lassen, als leichtere, minderwertige, ist wohl so zu verstehen, daß die ersteren naturgemäß eine größere Fähigkeit zur Sauerstoffbindung besitzen; dieselbe ist wohl sicher von den Kolloiden des Bodens abhängig, der Quarzsand dürfte dabei verhältnismäßig indifferent sein, also, je mehr Sand, desto weniger gebundener Sauerstoff.

Noch eine weitere Angabe, hinsichtlich deren R a h n und R i t t e r übereinstimmen, findet so eine einfache Erklärung: die Tatsache nämlich, daß nach Wiederbefeuchtung des Bodens die bewußte Erscheinung aufhört und der frühere Zustand wieder eintritt. Nach Wiederbefeuchtung wird das Bakterienleben im Boden neu erwachen und, da ja der Luftzutritt durch das Wasser teilweise gehemmt ist, wird die vorhandene Menge abspaltbaren Sauerstoffes in einiger Zeit aufgebraucht sein. Wenn es sich, wie oben angedeutet, um eine Oberflächen-Adsorption handelt, so würde beim Trocknen und beim Wiederbefeuchten des Bodens eine einfache Verdrängung stattfinden, hier des Sauerstoffes durch Wasser, dort umgekehrt.

In obigen Ausführungen scheint mir eine recht naheliegende Deutung der beobachteten Erscheinungen zu liegen, die nicht nur auf Grund unserer biologischen Kenntnisse leicht verständlich ist, sondern auch auf ihre Berechtigung experimentell ohne große Schwierigkeiten nachgeprüft werden kann, nur ein entsprechend eingerichtetes Laboratorium vorausgesetzt.

¹⁾ Man könnte auch die Frage in Erwägung ziehen, ob es sich vielleicht nicht um Verbindungen des Sauerstoffes, sondern um physikalische Bindung, A d s o r p t i o n, an den Oberflächen der Bodenteilchen handelt; für den Erfolg würde das freilich keinen Unterschied bedingen.

Neue Literatur,

zusammengestellt von

Prof. Dr. OTTO HAMANN,

Oberbibliothekar der Kgl. Bibliothek in Berlin.

Allgemeines, Lehrbücher usw.

Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Gärungs-Organismen und Enzymen. Unter Mitwirkung v. Fachgenossen, bearb. u. herg. v. Alfred Koch. Jg. 20. 1909. Leipzig (Hirzel) 1912. VIII, 660 p. 8°. 26 M.

Sadler, W., Bacteria as friends and foes of the dairy farmer. London 1912. 128 p. 8°. 1,50 M.

Untersuchungsmethoden, Instrumente usw.

Lindner, P., Ein Ersatzgefäß für die Petrischale bei der Pilzkultur und biologischen Analyse. (Wchschr. f. Brauerei. Jg. 29. 1912. No. 41. p. 589—590. 2 Taf.)

Pötter, Ed., Über ein neues alkoholometrisches Meßbesteck. (Ztschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. 29. 1912. Heft 2. p. 191—192.)

Systematik, Morphologie.

Eddelbüttel, H., und **Engelke, J.**, Ein neuer Pilz auf Platanenblättern *Microstoma platani* n. sp. (Mykol. Centralbl. Bd. 1. 1912. Heft 9. p. 274—277. 6 Fig.)

Summers, Sophia L. M., A new species of *Phlebotomus* from South America. Bull. of entomol. research. Vol. 3. 1912. Part 2. p. 209—210. 1 Fig.)

Biologie.

Baerthlein, Über Mutationserscheinungen bei Bakterien. (Arb. a. d. K. Gesundheitsamte. Bd. 40. 1912. Heft 4. p. 433—536. 8 Taf.)

Belonowski, G. D., Zur Frage über die Säureproduktion der Bulgarischen milchsauren Mikroben. (Milchwirtschaftl. Centralbl. 1912. Heft 15. p. 449—454.)

Carlson, Tor, Über die Zersetzung von Asparagin durch Bakterien in Gegenwart von freiem Sauerstoff. 2. Atmungsquotient und Vergasungsgrad. Uppsala, Berlin 1912. 13 p. 8°. 1 Fig. Aus Meddelanden f. vetenskapsakad. Nobelinst. —, 60 M.

Emmerling, O., Die neueren Arbeiten betreffend die Chemie der Alkoholgärung. (Mykol. Centralbl. Bd. 1. 1912. Heft 9. p. 267—273.)

Fischer, Ed., Beiträge zur Biologie der Uredineen (Forts.). 2. Zur Biologie von *Puccinia saxifragae* Schlechtend. (Mykol. Centralbl. Bd. 1. 1912. Heft 9. p. 277—284.)

—, Beiträge zur Biologie der Uredineen (Schluß). Mykol. Centralbl. Bd. 1. 1912. Heft 10. p. 307—313.)

Franzen, Hartwig, Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen. 5. Mitt. Über die Vergärung und Bildung der Ameisensäure durch Hefen. (Hoppe-Seylers Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 77. 1912. Heft 2. p. 129—182.)

Gorham, F. P., Some biochemical problems in bacteriology. (Science. N. S. Vol. 35. 1912. No. 897.)

Le Moulé, Léopold, Sur la destruction de certains Hémiptères par les parasites végétaux. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 155. 1912. No. 15. p. 656—658.)

Ramsbottom, J., Some recent work on the cytology of fungus reproduction 1 (Schluß). (Mykol. Centralbl. Bd. 1. 1912. Heft 9. p. 259—267.)

Rossi, Giacomo, Culture pure e fermenti selezionati nell' industria e nell' agricoltura. (Roma, tip. nazionale 1911. 27 p. 8°. Aus: Atti d. Soc. Ital. per il progresso d. sc. 4. Rinn. Napoli 1910.)

—, Azione dell' aria sui fermenti pectici aerobici. (Rendic. d. Soc. chim. Ital. Vol. 2. 1910. Fasc. 7. 5 p.)

— e **Ciaccia, M.**, Nuovo contributo allo studio della decomposizione dei vegetali. (Rendic. d. Soc. chim. Ital. Vol. 2. 1910. Fasc. 8. p. 5; Vol. 3. 1911. Fasc. 5. p. 3.)

—, Studi critici sperimentali sui fermenti pectici anaerobici. (Roma, tip. nazionale 1912. 8°. Sep. aus: In onore del prof. Angelo Celli nel 250. anno d'insegnamento. p. 325—348. 1 Taf.)

Schulze, Paul, Die Chemie der Hefe (Schluß). (Weinscar. f. Brauerei. Jg. 29. 1912. No. 38. p. 544—548.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zur unbelebten Natur.**Luft, Wasser, Boden.**

- Dvorak, Jos.**, Studien über die Stickstoffanhäufung im Boden durch Mikroorganismen. (Mit 1 Abbild. u. 3 Diagrammen.) (Ztschr. f. d. ldw. Versuchswesen i. Österreich. 1912. Heft 9. S. 1077—1122.)
- Lohnis, F.**, Ziele und Wege der bakteriologischen Bodenforschung. (Landw. Jahrb. 1912. Bd. 42. Heft 5. S. 751—765.)
- Rideal, Eric K.**, Chlorine a hypochlorites? (Surveyor. Vol. 42. 1912. No. 1080. p. 438.)
- Schwes, H.**, Un échec de l'épuration des eaux suspectes par le chlorure de chaux. (Technique sanitaire, Année 7. 1912. p. 23. p. 77.)
- Ziegeler, G. A.**, Leitfaden der Wasseruntersuchung. Nach eigenen Erfahrungen bearbeitet. 2. Aufl. Stuttgart (Enke) 1912. VIII, 129 p. 33 Fig. 8°. 3 M.

Fleisch.

- Viry, H.**, Les viandes frigorifiées. (Ann. d'hyg. publ. et de méd. lég. Sér. 4. T. 18. 1912. p. 193—211.)

Milch, Molkerei.

- Aufsberg, Th.**, Das Reifen der Milch für die Käserei. (Molkerei-Ztg. Hildesheim. Jg. 26. 1912. No. 72. p. 1353—1354.)
- Bremer, W., Greifenhagen, W. und Sauerwein, R.**, Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung der Milch u. d. zugehörnden Serums. (Ztschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel. 1912. Bd. 24. Heft 8. p. 507—512.)
- Burri, R.**, Reinkulturen oder Säuremischung beim Labansatz? (Molkerei-Ztg. (Bln.) 1912. No. 33. p. 387—389.)
- Corlay, L.**, L'utilité du dosage du bichromate de potasse ajouté aux laits pour retarder leur altération. (Ann. des falsifications. Année 5. 1912. No. 42. p. 173—175.)
- Engels, O.**, Milcherkrankungen infolge des Genusses vergifteter oder sonstiger schädlicher Futtermittel. (Deutsche landw. Presse. 1912. No. 68. p. 781.)
- Fodor, K. v.**, Studien über die Zusammensetzung des Liptauer Käsefettes. (Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel. 1912. Bd. 24. Heft 4. p. 265—269.)
- Freund, W.**, Joghurtprodukte des Handels. (Molkerei-Ztg. Hildesheim. Jg. 26. 1912. No. 78. p. 1468—1470.)
- Liska, Ant.**, Käsefabrikation aus pasteurisierter Milch. (Milchwirtschaftl. Centralbl. 1912. No. 16. p. 481—485. 13 Fig.)
- Morres, Wilhelm**, Die häufigsten Zersetzungsarten der Milch und ihr bestes Erkennungsmittel in der Hand des Molkereipraktikers. (Molkerei-Ztg. Berlin. Jg. 22. 1912. No. 38. p. 445—446.)
- Orla-Jensen, Maelkeri-Bakteriologi.** København 1912. 136 p. 8°. 53 Fig. 4 M.
- Svoboda, H.**, Untersuchungen von Kärntner Butter in den Jahren 1906/07. (Milchwirtschaftl. Centralbl. 1912. Heft 17. p. 513—530.)

Bier, Bierbereitung.

- Lindner, P.**, Die Assimilierbarkeit von Säure-, Bier- und Würzedextrinen durch verschiedene Hefen und Schimmelpilze. (Wehnschr. f. Brauerei. Jg. 29. 1912. No. 38. p. 541—544.)

Andere Nahrungsmittel.

- Majmone, Bartolo**, Una frequente alterazione delle conserve di pomodoro. Biella (Testa) 1911. 37 p. 8°. (Riv. di igiene e di sanità pubbl. Anno 22. 1911.)
- Dietzel, Leopold**, Über den Bakteriengehalt des Mehles. [Med. Diss.] Würzburg 1912. 8°.

Wohnungen, Abfallstoffe, Desinfektion usw.

- Hue, Edmond**, Etude bactériologique des Boues du Puits N. 1 du Vieux-Bram (Bretignolles, Vendée). (Compt. rend. Congrès préhist. de France. 7. sess. Nîmes 1911. p. 523—525.)
- Kallert, Eduard**, Wanddesinfektion durch direktes Besprengen mit Formalinlösung. (Desinfektion. Jgs. 1912. Heft 10. p. 295—321.)
- Rossi, G.**, La sterilizzazione dei semi ed il loro contenuto microorganico. (Rendic. d. Soc. chimica Ital. Vol. 2. 1910. p. 4.)
- Zikea, Heinrich**, Das Chinosol — ein Desinfiziens bei gährungsphysiologischen Arbeiten. (Allg. Ztschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. Jg. 40. 1912. No. 45. p. 499—500.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zu Pflanzen.

Krankheitserregende Bakterien und Parasiten.

- Brunet, Raymond**, Le traitement de la chlorose. (Rev. de viticult. Année 19. 1912. No. 982 p. 422—424.)
- Edler, W.**, Über merkwürdige Fraßbeschädigungen an Getreide. (Fühlings landw. Ztg. 1912. Heft 15. p. 512—514.)
- Föëx, et Berthault, P.**, Une maladie du mais de Cochinchine. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 155. 1912. No. 12. p. 552—554.)
- Grimm**, Ein neues Unkraut. (Praktische Bl. f. Pflanzenbau. 1912. No. 9. p. 108—109.)
- Hiltner, L., und Gentner, G.**, Einige Versuche u. Beobachtungen über die Ursachen des Kleekrebes. (Praktische Bl. f. Pflanzenbau. 1912. Heft 7. p. 73—79, Heft 8. p. 90—95.)
- , Über den Grad des Fusariumbefalles des Saatgutes von Getreide in den letzten Jahren. (Praktische Bl. f. Pflanzenbau. 1912. No. 9. p. 99—101.)
- Kirchner, O.**, Bericht über die Tätigkeit der K. Anstalt f. Pflanzenschutz in Hohenheim im Jahre 1911. (Württemberg. Wehnl. f. Landw. 1912. No. 27. p. 459, No. 28. p. 472.)
- Korff, G.**, Die Kartoffelmotte (*Phthorimaea operculella* Zell). (Zugleich Flugbl. No. 12 d. Agrik.-Bot. Anst. i. München. Praktische Bl. f. Pflanzenbau. 1912. No. 9. p. 101—106. Mit 2 Abb.)
- Krogmann**, Die Hafermilbe (*Tarsonemus spirifex*). (Landw. Ztg. f. Westfalen. 1912. No. 36. p. 402. Mit 2 Abb.)
- Lemcke, Alfred**, Insektenschädigungen am Getreide II. (Georgine. land- u. forstw. Ztg. 1912. No. 65. p. 454—455.)
- , Die graue Ackerschnecke. (Georgine. land- u. forstw. Ztg. 1912. No. 77. p. 550.)
- Lüstner, Gustav**, Über das Auftreten der Wanze (*Nysius senecionis*) in deutschen Weinbergen. (Mitt. über Weinbau u. Kellerwirtschaft. 1912. No. 9. p. 142—144. Mit Abb.)
- Morstatt, H.**, Die Schädlinge und Krankheiten des Kaffeebaumes in Ostafrika. (Der Pflanz. Beiheft No. 2. Jg. 8. Juli 1912. 87 p. u. 14 Taf.)
- Müller, H. C. und Morgenthaler, O.**, Schädigung von Rüben durch die „Graue Made“. (Deutsche landw. Presse. 1912. No. 72. p. 823. Mit Abb.)
- Müller, L.**, Die Bekämpfung des Getreidebrandes. (Hessische landw. Ztschr. 1912. No. 34. p. 646—649. Mit 7 Abb.)
- Oetken, W.**, Einige Beobachtungen über Steinbrand im Weizen. (Deutsche landw. Presse. 1912. No. 70. p. 803.)
- Osterwalder, A.**, Durch Bakterien verursachte Blüten- u. Zweigdürre bei Obstbäumen. (Hessische Obst- usw. Ztg. [Beiblatt z. Hess. landw. Ztschr.] 1912. No. 20. p. 129—130. Mit 2 Abb.)

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

- Fischer, Hugo**, Vom Trocknen des Bodens, p. 346.
- Kroulik, Alois**, Über thermophile Zellulosevergärer, p. 339.

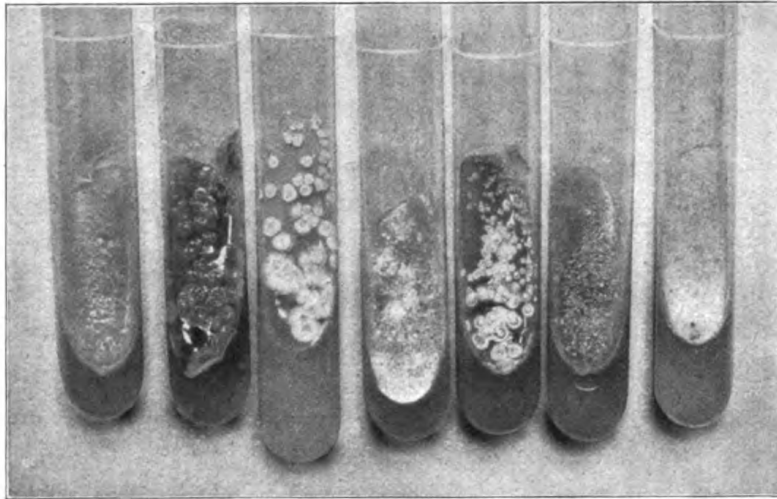
Müller-Thurgau und Osterwalder, A., Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen, p. 129.

Neue Literatur, p. 350.

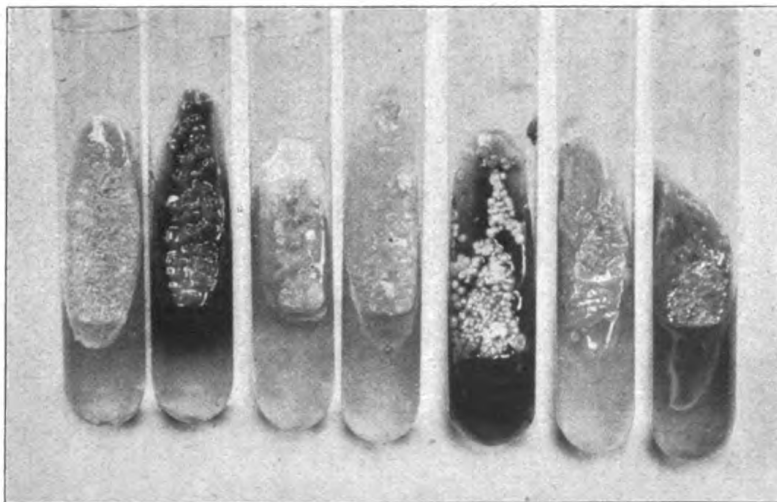
Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung **Gustav Fischer** in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 9. Dezember 1912.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.



1



2

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Nachdruck verboten.

Richtigstellung der Entgegnung von Dr. Max Munk zu meinen
Bemerkungen über dessen Arbeit: „Bedingungen der Hexen-
ringbildung bei Schimmelpilzen“.

Von Dr. E. Molz in Halle a. S.

Die Entgegnung von Dr. M a x M u n k¹⁾ auf meine Bemerkungen²⁾ zu seiner Hexenringarbeit³⁾ macht mehr den Eindruck einer prozessualen Replik, in der versucht wird, u n t e r a l l e n U m s t ä n d e n einen Dritten vom Gegenteil der Anklageschrift zu überzeugen, als den einer wissenschaftlich sachlichen Widerlegung. Seine Darlegungen bedürfen einer Klarstellung.

In meiner Arbeit: „Über die Bedingungen der Entstehung der durch *Sclerotinia fructigena* erzeugten Schwarzfäule der Äpfel“⁴⁾ habe ich folgendes gesagt:

„Manchmal treten aber auch in der Dunkelheit bei Plattenkulturen hier und da einige Ringe auf, die namentlich bei durchfallendem Lichte wahrnehmbar sind. Dieselben verdanken ihre Entstehung verschiedenen Ursachen. Zumeist stellen sie eine wellenartige Aufbauchung des Thalloms dar, die entsteht infolge der verschiedenen Spannungswiderstände eines unter wechselnder Temperatur gewachsenen Mycelbelages, oder aber die Gelatine erhält bei etwas höherer Temperatur eine flüssige Beschaffenheit, infolge welcher die Mycelenden einsinken und dann bei wieder sinkender Temperatur ein ringförmiges Einsenkungsfeld des Thalloms bilden.“

Diese Stelle meiner Arbeit gibt M u n k in seiner Hexenringarbeit nun wie folgt wieder:

„Auch M o l z sieht die Wirkung des Lichtes auf die Ringbildung für eine direkte an, doch hebt er deutlich hervor, daß das Licht wohl nicht der einzige Faktor ist, welcher Hexenringbildung herbeiführt. Als einen zweiten Faktor führt er die Temperatur an. Das Pilzmycel sinkt bei hoher Temperatur in die flüssig gewordene Gelatine hinein, kann also keine Früchte bilden. Nimmt die Temperatur ab, so erstarrt die Gelatine wieder, das Mycel wächst deshalb auch wieder an der Oberfläche und produziert Konidien. Auf diese Weise stellt sich M o l z das abwechselnde Entstehen von Mycelringen und Fruchtringen auf Gelatinekulturen vor.“

Es erübrigt eigentlich, darauf hinzuweisen, daß diese Darstellung M u n k s etwas ganz anderes besagt, wie die angezogene Stelle meiner Arbeit. Die Art der Entstehung der von mir in der Dunkelheit bei Plattenkulturen beobachteten Zonenbildung wird von M u n k erstens nur fragmentarisch wiedergegeben, und zweitens ist der Inhalt des von ihm angeführten Teiles und die daran geknüpfte Bemerkung d u r c h a u s f a l s c h , denn bei

¹⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 561.

²⁾ Ebenda. p. 40.

³⁾ Ebenda. Bd. 32. p. 353.

⁴⁾ Ebenda. Bd. 17. 1907. p. 183.

meinen diesbezüglichen Versuchen sind überhaupt keine Fruchtringe aufgetreten, also kann ich mir das abwechselnde Entstehen von Mycelringen und Fruchtringen auch nicht in der von Munk angegebenen Weise vorstellen.

Hören wir aber, wie Munk¹⁾ sich rechtfertigt:

„Aus den Ausführungen von Molz in seiner Arbeit über *Sclerotinia fructigena* ist nicht zu entnehmen, daß die im Dunkeln entstandenen Ringe keine Fruchtringe sind. Molz spricht dort²⁾ 28 Zeilen lang vor dem Abschnitt, den er in seinen Bemerkungen zitiert, von der ringartigen Anordnung der „Fruktifikationsorgane“, und direkt nach dem zitierten Abschnitt fährt er folgendermaßen weiter: „Sehr häufig zeigen die faulwerdenden Früchte (Äpfel) sehr unregelmäßige Ringbildungen oder gar vollkommen regellose Verteilung der Fruchtpolster.“ Also vor und nach dem zitierten Abschnitt spricht Molz stets von Fruchtringen, nirgends hebt er aber darin hervor, daß es sich bei seinen Dunkelkulturen nur um Mycelringe und nicht um Fruchtringe handelt.“

Es ist mir schier unverständlich, wie Munk durch eine derartige, alles andere als objektive Rechtfertigung seine Sache verteidigen kann. Gerade der Umstand, daß ich in meinen, der fraglichen Stelle vorausgehenden und folgenden Ausführungen stets von Fruktifikationsringen oder Fruchtpolstern gesprochen habe, die in der Streitstelle angeführten Ringe aber charakterisiere als eine „wellenartige Aufbauchung des Thalloms“, bzw. „ringförmiges Einsenkungsfeld des Thalloms“ infolge Einsinkens der Mycelenden, gibt einer Deutung in Munkschem Sinne nicht den geringsten Spielraum. Es klingt geradezu paradox, wenn Munk seine oben angeführte Rechtfertigung wie folgt weiterführt: „Der Vorwurf, den Dr. E. Molz wegen der angeblichen falschen Auslegung seiner Ausführungen mir macht, ist also durchaus unbegründet, denn wie ich gezeigt habe, liegt es lediglich an der Darstellung von Dr. E. Molz, die diese meine Auslegung als die einzig mögliche und wahrscheinlichste zuließ.“

Weiter sei noch darauf hingewiesen, daß der von mir eingeschobene Satz p. 41. 2. Absatz meiner Bemerkungen³⁾: — „soweit sie von Munk herangezogen wird“ —, von diesem in seiner Entgegnung gänzlich außer acht gelassen wird, da dies für seine Ausführungen offenbar zweckdienlicher erschien. So wird dem Inhalt meiner diesbezüglichen Erörterung aber ein falscher Sinn unterschoben. — Gegen eine derartige Kampfweise muß energisch Front gemacht werden.

Was den Einwand Munks bezüglich der Priorität des Amerikaners George Grant Hedgecock⁴⁾ für den Nachweis des Einflusses von Licht und Dunkelheit auf die Zonenbildung bei Schimmelpilzen anbetrifft, so danke ich ihm für diese Aufklärung. Immerhin muß ich zur Sache bemerken, daß meine zur Aufhellung des Hexenringproblems mit *Sclerotinia fructigena* angestellten Versuche bereits im Jahre 1905 begannen (vergl. l. c. p. 178), und daß das Manuskript schon am 21. August 1906 der Redaktion des Centralblattes zum Druck übergeben worden war. Auf jeden Fall wäre meine Arbeit bereits im Jahre 1906 (also gleichzeitig mit

¹⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 563.

²⁾ Ebenda. Bd. 17. 1907. p. 182—183.

³⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912.

⁴⁾ Report Missouri Botan. Garden. Vol. 17. 1906.

derjenigen H e d g c o c k s) herausgekommen, wenn nicht die Herstellung der beigegebenen Farbentafeln ihr Erscheinen verzögert hätte. Da jedoch H e d g c o c k seiner im Jahre 1906 erschienenen Arbeit die Bemerkung vorausschickt, daß er bereits im Dezember 1904 der Versammlung der amerikanischen mycologischen Gesellschaft in Philadelphia in einem kurzen Schreiben von seinen Versuchsergebnissen Kenntnis gegeben habe, so steht seine Priorität im vorliegenden Falle außer Zweifel.

Auch auf die weiteren Streitfälle sei kurz eingegangen. M u n k sagt in seiner Hexenringarbeit:

„Es bleibt noch zu erwähnen, daß der alkalische Agar, den ich zu meinen Kulturen benutzte, nicht flüssig war, wie der R e i d e m e i s t e r s, sondern im Gegenteil eine viel kompaktere Gallerte darstellte als reiner Agar. Höchstwahrscheinlich ist in ihm die Diffusionsgeschwindigkeit eine viel geringere, was auf die Ringbildung noch begünstigend einwirken mag.“

Wenn ich daraus den Schluß ableitete, daß M u n k die Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit und des dadurch bewirkten effektiven Einflusses auf die Ringbildung zurückgeführt habe, auf die k o m p a k t e r e Gallerte des alkalischen Agars im Vergleich zu flüssigem Agar, während M u n k nun angibt¹⁾, daß das, was er von der Diffusionsgeschwindigkeit gesagt habe, sich nur auf den alkalischen Agar bezöge, so dürfte an meiner Auffassung doch wohl die M u n k s c h e Darstellungsweise etwas schuld sein. Dieser versieht in seiner Entgegnung²⁾ den obenangeführten Satz mit zwei Klammerbemerkungen, womit er der Unklarheit seiner ersten Darstellung ein großes Zugeständnis macht. Nachdem so die betreffende Stelle einen eindeutigen und meiner Auffassung nicht entsprechenden Sinn erhalten hat, nehme ich die darauf bezüglichen Bemerkungen ohne Anstand zurück.

Bemerken möchte ich aber noch hierzu, daß bei meinem für diesen Fall von mir angezogenen Versuche mit Obstsaft nicht nur die Fruchtbildung, sondern auch die Ringbildung gleichsinnig beeinflusst wurde, da ich andernfalls in meiner Arbeit, in der dem Problem der Hexenringbildung besondere Aufmerksamkeit geschenkt wurde, ausdrücklich auf das Entstehen von Ringen, wie das auch sonst bei der Darstellung meiner Versuche geschah, hingewiesen hätte.

Weiter heißt es in M u n k s Entgegnung: „Sein (M ö l z³⁾ Experiment zeigt, daß das Mycelium von *Sclerotinia fructigena* in einem flüssigen Medium nicht zu fruktifizieren vermag. Diese Tatsache ist aber schon früher ausführlich von K l e b s⁴⁾ untersucht und behandelt worden.“

Es lag mir in dem von M u n k angezogenen Experiment durchaus fern, in diesem Sinne etwas Neues bieten zu wollen, oder eine Priorität gegenüber K l e b s geltend zu machen, was ohne weiteres klar daraus hervorgeht, daß ich in meiner *Sclerotinia*-Arbeit meinem diesbezüglichen Versuche folgendes vorausschicke⁵⁾:

„L e n d n e r⁶⁾ hat bei seinen Untersuchungen sein Augenmerk besonders

¹⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 564.

²⁾ Ebenda. p. 564.

³⁾ Der Verf.

⁴⁾ Die Bedingungen der Fortpfl. bei einigen Algen und Pilzen. 1896; Zur Physiol. d. Fortpfl. einiger Pilze. 1900.

⁵⁾ L. c. p. 184.

⁶⁾ Ann. d. scienc. nat. Sér. VIII. T. III, 1897. p. 60.

dem Einfluß der Beschaffenheit des Substrates auf verschiedene Pilze zugewendet und dabei die Tatsache konstatiert, daß die Unterschiede, die sich bei festen und flüssigen Nährmedien bezüglich der Anlage und Ausbildung der Fruktifikationsanlage ergeben, in vielen Fällen den bei Licht- und Dunkelwachstum resultierenden Unterschieden gleichen. Meine bei *Sclerotinia fructigena* angestellten Beobachtungen liefern auch für diese Feststellungen neues Sammelmateriel, denn die Entwicklung unseres Pilzes auf flüssigen Nährmedien hat bezüglich der Ausbildung der Fruktifikationsorgane eine große Ähnlichkeit mit den in Dunkelheit auch auf festem Substrat gewachsenen Kulturen. Die spärliche Sporenbildung der *Monilia* auf Fruchtsaft wurde übrigens schon im Jahre 1894 durch Wortmann¹⁾ wahrgenommen und später durch Behrens²⁾ nochmals bestätigt.“

Die ausgezeichneten, mir von Munk entgegengehaltenen Arbeiten von Klebs waren mir wohl bekannt. Wenn ich trotzdem mir dessen Auffassung nicht zu eigen gemacht habe, so liegt das daran, daß verschiedene Momente in der Biologie von *Sclerotinia fructigena*, z. B. das Fruktifizieren auf in Fruchtsaft schwimmenden porösen Holzstückchen, nicht ohne weiteres mit der Klebschen Theorie, daß die leichtere oder schwierigere Wasseraufnahme durch das Mycelium für die Ausbildung der Konidienträger entscheidend sei, in Einklang zu bringen waren.

Wenn aber Munk meiner hypothetischen Erklärung des biologischen Verhaltens von *Sclerotinia fructigena* auf Flüssigkeiten gegenüber festen Nährmedien durch den Einwand, daß nach den Untersuchungen von Graham³⁾ und Voigtländer⁴⁾ die Diffusionsgeschwindigkeit in Agar, resp. Gelatine beinahe dieselbe wie in Wasser sei, den Boden zu entziehen versucht, so möchte ich nicht unterlassen, darauf etwas näher einzugehen, da auch dieser Fall wieder charakteristisch für die Art der Munk-schen Argumentationen ist.

Die Graham'schen Versuche ergaben wohl, daß die Diffusion einer Kristalloids substanz in einer steifen Gelosegallerte mit kaum geringerer Geschwindigkeit als im Wasser stattfindet. Doch beschränkt sich die Beweisführung Graham's nur auf die Diffusion des Kochsalzes. Diese Beobachtungen wurden aber später von Stefan⁵⁾, der auf die Fehlerquellen der Graham'schen Versuchsanordnung aufmerksam macht, theoretisch neu berechnet, und dieser fand nun, daß die Diffusionsgeschwindigkeit des Chlornatriums durch Gallerte geringer ist, als die durch reines Wasser.

Auch die Versuche Voigtländers sind nicht eindeutig im Sinne Munk's, denn dieser Forscher schließt seine diesbezüglichen Untersuchungen mit dem Satze (l. c. p. 331): „die Frage, ob die Diffusion in Agar und Wasser identisch ist, wird erst endgültig entschieden werden können, wenn weitere Beobachtungen an reinem Wasser oder an einer anderen Gallerte, etwa Kieselsäuregallerte, gemacht worden sind.“

Angesichts dieses Tatbestandes muß von Dr. Max Munk doch in der Folge mehr Vorsicht in seiner Beweisführung gefordert werden.

Der Munk'sche Vorwurf in seiner Entgegnung, daß ich das Problem

¹⁾ Ber. d. Kgl. Lehranst. Geisenheim. 1894/95. p. 64.

²⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. p. 517.

³⁾ Lieb. Annal. Bd. 121. 1862.

⁴⁾ Zeitschr. f. physik. Chemie. 1889.

⁵⁾ Sitzungsber. d. Wien. Akad., Math.-Naturw. Kl. Abt. II. Bd. 79. 1879.

der Fruchtbildung mit dem der Ringbildung indentifiziere, wird sofort hin-fällig, sobald sich Dr. Munk nur einmal der Mühe unterziehen wollte, die meiner Sclerotinia-Arbeit beigegebenen Versuchstabellen einzu-sehen, und es unterlassen würde, aus dem Zusammenhang gegriffene Zitate ohne Zuhilfenahme dieser Tabellen im Gesichtsfelde seiner subjektiv stark ge-trübten Lupe zu schauen.

Für die Flüchtigkeit des Munk'schen Quellenstudiums oder für sei-ne Art zu polemisieren sprechen auch, wie wir sehen werden, die Schlußbetrach-tungen seiner Entgegnung. Dort heißt es:

„Wenn also Dr. E. Molz am Schlusse seiner Bemerkungen anführt, er habe schon „die Frage nach dem chemischen Einfluß des Substrates und (dem Einfluß¹⁾ der Temperatur auf die Konidien- bzw. Ringbildung ange-schnitten und zum Teil experimentell bearbeitet“, so beruht das eben auf einem Irrtum. Das was Molz in seiner Arbeit über chemischen Einfluß und Temperatureinwirkung schreibt, bezieht sich (mit Ausnahme der zu An-fang diskutierten Stelle) nur auf die Fortpflanzung, nicht (Fettdruck nach Munk²) auf die Ringbildung bei Sclerotinia fructigena“.

Wenn Munk sich meine Arbeit etwas genauer angesehen hätte, so wären ihm wohl die folgenden Versuche (l. c. p. 181 u. 182) nicht ent-gangen:

„Für den nachfolgenden Versuch wurde Nährgelatine unter Verwendung von Apfel-, Birnen- und Traubenmost hergestellt.

Der verwandte Apfelmmost enthielt **0,36 Proz. Ges.-Säure** als Weinsäure berechnet

„ „ Birnenmost „ **0,54** „ „ „ „ „ „

„ „ Traubenmost „ **1,04** „ „ „ „ „ „

Diese Mostarten wurden zunächst mit 10 Proz. weißer Gelatine aufgeköcht, dann filtriert und sterilisiert. **Ein Teil der so gewonnenen Nährgelatine wurde mit Kalilauge neutralisiert³⁾.**

IV. Versuch. Beginn am 3. April 1906.

Dunkelkulturen bei 18–20° C.

Versuchs-nummer	Versuchsbedingungen	Resultat am 29. März
44	vier Plattenkulturen auf Apfelgelatine	Fruktifikation nur in einzelnen weißen Polsterchen in der Nähe des zen-tralen Teils des Thalloms (Taf. II, Fig. 1)
45	vier Plattenkulturen auf Birnen-gelatine	in der Nähe des Zentrums ein un-regelmäßiger und relativ breiter (1,5 cm) Fruktifikationsring mit schwacher Sporenbildung, sonst steril
46	vier Plattenkulturen auf Trauben-gelatine	im zentralen Teil ein mehr oder weniger ringförmig angeordnetes Fruktifikationsfeld mit schwacher Sporenbildung, sonst steril
47	vier Plattenkulturen auf neutraler Apfelgelatine	sie bilden im zentralen Teil eine un-regelmäßig kreisförmige Frukti-fikationsfläche von 40–45 mm Durchmesser und normaler Braun-gelbfärbung, der äußere Teil des Thalloms bleibt steril

¹⁾ Munk.

²⁾ Der Verf.

³⁾ Dieser Satz und die in der Tabelle fettgedruckten Stellen sind nur hier in dieser Weise hervorgehoben.

Versuchsnummer	Versuchsbedingungen	Resultat am 29. März
48	vier Plattenkulturen auf neutraler Birngelatine	wie bei No. 47
49	vier Plattenkulturen auf neutraler Traubengelatine	wie bei No. 47
50	vier Plattenkulturen auf Apfelgelatine, anfänglich als Dunkelkultur, später als Lichtkultur behandelt	das Thallom wuchs als Dunkelkultur fast steril, bildete später aber als Lichtkultur schöne Fruktifikationsringe
51	vier Plattenkulturen auf Apfelgelatine anfänglich als Lichtkultur, später als Dunkelkultur behandelt	zeigte umgekehrtes Verhalten wie No. 50
52	vier Plattenkulturen auf Apfelgelatine aus der Dunkelstellung 1 Tag in Lichtstellung	es bildete sich auf der sonst sterilen Kultur ein deutlicher Fruktifikationsring (Taf. I, Fig. 2)
Dunkelkulturen bei 23—33° C		
53	wie No. 44	Thallom fast ganz steril, nur hier und da einige torulierte Hyphen
54	wie No. 45	nur im zentralen Teil schwache Fruktifikation
55	wie No. 47	Fruktifikation in unregelmäßig stehenden Polsterchen auf der ganzen Platte, im zentralen Teil (in einem Durchmesser von 35—40 mm) am stärksten (Taf. II, Fig. 2)
56	wie No. 48	wie bei No. 55
Lichtkulturen bei 18—20° C		
57	wie No. 44	gut markierte Fruktifikationsringe (Taf. I, Fig. I)
58	wie No. 45	wie bei No. 57
59	wie No. 46	das Wachstum des Thalloms etwas langsamer als bei No. 57 und 58; die Ringe sind deshalb auch dichter, aber gut markiert
60	wie No. 47	Fruktifikation gut, Ringbildung vorhanden, aber undeutlich, da die ganze Fläche fruktifiziert
61	wie No. 48	Fruktifikation gut, Ringbildung bei auffallendem Lichte fast verschwunden , die ganze Kultur bildet oberseitig ein gleichmäßiges Fruktifikationsfeld
62	wie No. 49	Fruktifikation deutlich in Ringen
Lichtkultur bei 7° C		
65	eine Plattenkultur auf Apfelgelatine an einem Westfenster, Temperatur durch die Schale umspülendes Wasser konstant auf 7° C gehalten	das Wachstum des Thalloms sehr langsam, namentlich im Anfang; Fruktifikation sehr spärlich in Form eines hellbräunlichen Anfluges ohne Ringbildung ; später stieg die Temperatur auf 8—9° C und das Mycelwachstum war infolgedessen etwas schneller, jetzt auch Ringbildung vorhanden.

Wir ersehen aus den vorstehenden Versuchen, daß sowohl der Einfluß der Temperatur (außer dem von Munk erörterten Falle), wie auch derjenige eines sauren und neutralen Nährmediums unter Verwendung von Obstsäften mit verschiedenem Säuregehalt auf die Ringbildung von mir bereits studiert wurde. Es beruht also keineswegs, wie Munk in seiner Entgegnung angibt, auf einem Irrtum, daß die Frage nach dem Einfluß der Temperatur und des Nährmediums auf die Ringbildung von mir bereits „angeschnitten und zum Teil experimentell bearbeitet wurde“.

Munk hätte nach dem Vorgegangenen alle Ursache gehabt, sich in meine Arbeit mit größerer Gründlichkeit zu vertiefen. Als Kenner dieses Gebietes würde er sich dann mit nicht allzugroßer Mühe in dem Gang meiner Untersuchungen zurechtgefunden, und es dann wohl auch in seinem eigensten Interesse nicht unterlassen haben, meine Beobachtungen mit den seinigen sorgfältig in Beziehung zu bringen.

Nachdruck verboten.

Zur letzten Replik des Herrn Dr. E. Molz.

Von Dr. Max Munk.

Der Ton, den Herr Dr. Molz in seiner letzten „Richtigstellung“ angeschlagen hat, überschreitet die Grenzen des für wissenschaftliche Polemik Zulässigen und veranlaßt mich, nichts weiteres in dieser Sache zu sagen.

Herr Dr. E. Molz bringt in seiner letzten „Richtigstellung“ weder neue Tatsachen, noch neue Versuche. Ich verweise daher an dieser Stelle auf meine Arbeit „über die Bedingungen der Hexenringbildung“ und auf meine Entgegnung zu den Molzschen Bemerkungen.

Nachdruck verboten.

Micrococcus mucofaciens n. sp., ein Milchsäurebakterium.

[Aus der bakteriologischen Abteilung des schweiz. Gesundheitsamtes in Bern.]

Von Dr. J. Thöni und Dr. A. C. Thaysen.

Ein Milchwirtschaftler der Stadt Bern übermittelte einem hiesigen Laboratorium im Laufe des Frühjahrs eine Milchprobe zur bakteriologischen Untersuchung mit dem Bemerkung, daß die Milch seit einiger Zeit fadenziehend werde, wobei besonders die Rahmschicht diesen Fehler ausgeprägt aufweise. Auch die vorliegende uns zugestellte Probe zeigte diese abnorme Beschaffenheit sehr deutlich.

In den zur Feststellung des mikroskopischen Bildes der fraglichen Milch angefertigten Ausstrichpräparaten waren neben dem gewöhnlichen Milchsäurebakterium, *Bact. Güntheri*, sehr zahlreiche Kokken vertreten und zwar als Diplokokken und Tetraden. Auf den zum Zwecke der Isolierung der Keime mit Material dieser Milch beschickten Nährmedien (Gelatineplatten und Schottenagarhoheschichtkulturen) konnten indessen

keine von den gewöhnlich die fadenziehende Beschaffenheit der Milch in hiesiger Gegend bedingenden Bakterienarten (*Micr. Freudenreichii* und schleimbildende Rassen von Milchsäurebakterien) angetroffen werden. Dagegen hatten sich auf den Gelatineplatten zahlreiche gelbliche, fadenziehende, anscheinend die Gelatine nicht verflüssigende Kolonien eingefunden, die den Mikrokokken angehörten. Die schleimig-fadenziehende Eigenschaft dieser Kolonien ließ den Verdacht als naheliegend erscheinen, sie könnten die Urheber der abnormen Beschaffenheit der Milch sein. Eine Überimpfung von Material solcher Kolonien in sterile und rohe Milch bestätigte die Vermutung, indem sämtliche Proben schon nach kurzer Zeit ausgesprochen fadenziehend wurden und zwar besonders jeweilen die Rahmschicht.

Bei der Einlieferung der Milchprobe war angeordnet worden, daß bei dem die fadenziehende Milch liefernden Landwirt die Melk- und Transportgefäße, ferner die zur Reinigung dieser Gefäße benutzten Bürsten und Tücher eine zeitlang in kochendem Wasser gehalten und dann noch mit Sodawasser und gewöhnlichem Wasser gewaschen werden. Nach Ausführung der angedeuteten Maßregel zeigte die Milch wieder normale Beschaffenheit.

Das Vermögen, die Milch schleimig-fadenziehend zu machen, kommt bekanntlich einer relativ großen Anzahl von Bakterienarten zu. Es war nun für uns von Interesse, festzustellen, ob sich der aus vorliegender Milch isolierte Coccus mit einem der schon bekannten Erreger der fadenziehenden Milch identifizieren lasse. Zu diesem Zwecke wurden seine morphologischen und kulturellen Eigenschaften, sein biologisches und physiologisches Verhalten näher geprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchung finden sich nachstehend zusammengestellt.

Mikroskopisches Aussehen.

Im allgemeinen ist der eigentliche Kokkentypus vorherrschend, doch finden sich häufig einseitig abgeplattete Zellen, die gewöhnlich zu zweien mit den abgeplatteten Seiten aneinanderliegen, sogenannte Semmelformen. Hie und da können auch nicht ganz isodiametrische und schwach ovale Formen beobachtet werden. Meistens tritt er auf als Einzel- oder Diplococcus, zuweilen auch in Tetradenform oder zu Haufen vereinigt. Sehr hübsch ausgebildete Tetraden finden sich meistens in den flüssigen Nährmedien und bei der Optimaltemperatur. Wie die Form, so differiert auch die Größe der Zellen nicht unwesentlich. Bei den in verschiedenen Nährmedien gezüchteten Organismen schwankt der Durchmesser, bei in hängendem Tropfen oder mittelst Tusche bereiteten Präparaten, von 0,5—2,4 μ . Vorwiegend ist jedoch die Größe von 0,8—1,6 μ im Diameter. Eigenbewegung war nie zu beobachten.

Färbbarkeit.

Die Färbung erfolgt leicht mit den gewöhnlichen Anilinfarben und auch nach Gram.

Ansprüche an Temperatur.

Das Wachstumsoptimum liegt bei ca. 33° C. Der Coccus wächst aber auch bei Temperaturen von 22—42° C. Bei 18° ist jedoch die Entwicklung schon wesentlich verlangsamt und bei 8° scheint sie beinahe aufgehoben zu sein.

Wachstum auf den verschiedenen Nährböden.**Gelatineplatten bei 20—23° C.**

Nach 2 Tagen sind in der Gelatine mikroskopisch kleine, grauweiße Pünktchen sichtbar. Nach 5 Tagen erscheinen die Kolonien hellgelb, die in der Tiefe gelegenen sind kugelig und besitzen einen Durchmesser von kaum $\frac{1}{4}$ mm, während die Oberkolonien saftigglänzend, rund, ganzrandig, und stecknadelkopfförmig sind und einen Durchmesser von 1 mm erreichen. Bei schwacher Vergrößerung erscheint die Struktur feinkörnig. Die Konsistenz sowohl der Oberflächen- wie der Tiefenkolonien ist ausgesprochen fadenziehend. Vom 10. Tage ab zeigen vereinzelte Oberflächenkolonien eine radiäre Streifung und ein dichteres Zentrum, auch ist die Randzone hier und da schwach gelappt. Mit dem Alter werden verflacht sich allmählich die anfänglich gleichmäßig gewölbte Kuppe der Oberflächenkolonien. Diese stellen dann runde Scheiben dar, deren Oberflächen gewöhnlich mehrere konzentrisch angeordnete Vertiefungen (Ringe) aufweisen. Im Alter von 25 Tagen ist sodann bei einzelnen Oberflächenkolonien ein schwaches Einsenken in die Gelatine zu bemerken, und bei einigen davon zeigt sich auch bereits eine schmale Zone verflüssigter Gelatine ringsum die Kolonie herum. Die Verflüssigung schreitet äußerst langsam weiter, wobei eine tellerförmige Vertiefung in der Gelatine entsteht; die Kolonie löst sich dabei in Flocken auf. Bei 40 Tage alten Gelatinekulturen ist die Großzahl der Oberflächenkolonien eingesenkt, doch ist bei vielen davon noch kein deutlicher „Verflüssigungshof“ zu beobachten.

Agarplatten bei 35—37° C.

Nach 24 Stunden haben sich ca. 0,2 mm große Kolonien von gelbbrauner Farbe eingestellt. Ihre Struktur ist grobkörnig. Die Oberflächenkolonien sind glattrandig, flach und kreisrund, die Tiefenkolonien kugelig und wetzsteinförmig. Die Konsistenz ist ebenfalls schleimig-fadenziehend. 48 Stunden alte Oberflächenkolonien besitzen bereits eine Größe von 1 mm im Durchmesser.

Gelatinestrichkultur bei 20—23° C.

Nach Verlauf von 4 Tagen ist das Wachstum noch sehr schwach. Längs des Impfstriches hat sich ein feiner, stellenweise aus einzelnen Kolonien bestehender, gelbbrauner Belag gebildet. Er ist deutlich fadenziehend. Der Nährboden zeigt auch nach 20 Tagen noch keine Verflüssigung, indessen ist eine schwache Einsenkung um den Rasen herum bemerkbar. Nach 26 Tagen findet sich der Belag infolge inzwischen eingetretener Verflüssigung der Gelatine auf dem Boden des Reagensglases, zusammen mit ein wenig verflüssigter Gelatine. Die frühere Lage desselben ist durch eine rinnenförmige Einsenkung in der schiefen Gelatineebene gekennzeichnet.

Agarstrichkultur bei 35—37° C.

Dem Impfstrich entlang entsteht eine gelbbraune, saftigglänzende, mäßig erhabene Auflagerung mit feinzackigem Rand. Der Belag ist sehr stark fadenziehend und behält diese Eigenschaft selbst mehrere Monate.

Milchagarstrichkulturen bei verschiedenen Temperaturen.

Bei Zimmertemperatur bildet sich dem Strich entlang nach 16 Stunden ein mäßig ausgebreiteter, weißlichgelber Belag. Das sogenannte Kondenswasser ist getrübt; Auflagerung und Kondenswasser sind stark fadenziehend. Bei 33° C ist der Kulturrasen nach 16 Stunden wesentlich kräftiger entwickelt als bei Zimmertemperatur, er erreicht zu dieser Zeit eine Breite von 4—5 mm; auch ist derselbe hier am stärksten fadenziehend. Bei 37° C nimmt die Mächtigkeit der Auflagerung eine Mittelstellung ein zwischen den bei Zimmertemperatur und bei 33° C gewachsenen Kulturen, während dagegen das Wachstum bei 40° C deutlich schwächer ist als bei Zimmertemperatur. Der Belag ist auch bei 33, 37 und 40° C von weißlichgelber Farbe und saftigglänzend.

Kartoffelkultur bei 32—34° C.

Auf Kartoffelscheiben entstehen nach einigen Tagen ziemlich breite, mäßig erhabene, hellgelbe, saftigglänzende und stark fadenziehende Streifen, die mit der Zeit eine dunklere, cremefarbige Nuance annehmen.

Gelatinestichkultur bei 23° C.

Erst nach 4 Tagen stellt sich eben erkennbares Wachstum ein. Nach 12 Tagen ist an der Oberfläche eine gelbbraune, saftigglänzende, mäßig ausgebreitete, flache Auflagerung. Längs des Stichkanals ist das Wachstum selbst nach 20 Tagen sehr spärlich: feiner aus lauter Körnchen bestehender Faden. Nach 26 Tagen beobachtet man um den inzwischen schwach eingesunkenen Belag eine Zone verflüssigter Gelatine. Der Rasen ist zu dieser Zeit sehr stark fadenziehend.

Agarstichkultur bei 37° C.

Nach 24 Stunden fadenförmiges bis schwach bandförmiges Wachstum; in den oberen zwei Dritteln des Stichkanals kräftiger als weiter unten. Um die Stichöffnung bildet sich anfänglich ein mäßig ausgebreiteter und erhabener, saftigglänzender, weißlichgelber Belag, der später die Einstichöffnung kuppenförmig überdeckt.

Bouillonkultur.

Die Bouillon wird selbst bei der Optimaltemperatur (33° C) nur mäßig getrübt. Am Boden des Kulturgefäßes entsteht ein weißes Sediment, das beim Schütteln in zusammenhängendem, spiralig gedrehtem Strang aufwirbelt. Die Flüssigkeit ist nicht fadenziehend.

Schottenkultur.

Das Wachstum ist hier ein analoges wie in Bouillon, nur etwas kräftiger.

Milchkulturen bei 22 und 35° C.

Bei 22° C aufgestellte Milch ist nach 18 Stunden makroskopisch unverändert, dagegen zeigt sich bei der Prüfung der Konsistenz die Rahmschicht bereits ausgesprochen fadenziehend. Nach 42 Stunden ist die ganze Masse fadenziehend. Bei 5 Tage alten Kulturen erscheint die Milch dann in 3 Schichten getrennt: eine aufliegende Rahmschicht, darunter eine dünne, gelbbraune Schicht und zu unterst die makroskopisch nicht veränderte

Magermilch. Die gelbbraun verfärbte Schicht wird mit der Zeit immer mächtiger und stellt eine zusammenhängende Schleimmasse dar. Ein Gerinnen der Milch war auch bei 9tägigen Kulturen nicht zu beobachten.

Bei 35° C ist die Milch, ohne sichtbar verändert zu sein, schon nach 16 Stunden stark fadenziehend, wobei auch wieder die Rahmschicht diese Eigenschaft am ausgeprägtesten zeigt. Im Laufe des zweiten Tages stellt sich dann die auch bei 22° C beobachtete und hier in analoger Weise erfolgende Trennung der Milch in 3 Schichten ein. Zu dieser Zeit ist die Milch noch flüssig und amphoter. Am 3. Tage ist die Milch bei schwach saurer Reaktion geronnen. Die drei Schichten, wovon die braungelbe sehr mächtig geworden ist, zeigen dann in bezug auf Konsistenz folgendes Verhalten: Bei Eintauchen der Platinnadel können mit der Rahmschicht 30—40 cm, mit der gelbbraunen Schicht mehrere Meter lange Fäden erhalten werden, während die unterste, ein festes Coagulum darstellende Schicht, nunmehr sehr schwach fadenziehend ist.

Selbst mehrere Monate alte Milchkulturen sind noch deutlich fadenziehend.

Traubenzuckeragarhoheschichtkultur bei 37° C.

Das Wachstum geht hier nur in eine Tiefe von ca. 1 cm. Keine Vergärung.

Milchzuckeragarhoheschichtkultur bei 37° C.

Gleiches Verhalten wie in Traubenzuckeragar.

Widerstand gegen Wärme.

Je 10 ccm sterile Milch mit je 0,2 ccm einer Aufschwemmung unseres Coccus versetzt und während verschiedenen Zeiten im Wasserbade Temperaturen von 60, 70, 75 und 80° C ausgesetzt ergab folgendes Verhalten: Bereits eine Einwirkungsdauer von 30 Minuten bei 60° C genügt zur Abtötung, ebenfalls findet keine Entwicklung mehr statt nach einem 5 Minuten langen Einwirken einer Temperatur von 70° C.

Widerstand gegen Desinfizientien.

Als Desinfektionsmittel verwendeten wir Kalkmilch. Von einer 24 Stunden alten gut angegangenen Bouillonkultur des Coccus wurden gleiche Mengen Kultur mit Kalkmilch von verschiedener Konzentration eine bestimmte Zeit lang aufeinander einwirken gelassen und dann eine große Öse davon in Bouillon übergeimpft. Die Abtötung des Coccus erfolgte in 1-proz. Lösung nach 30 Minuten.

Prüfung auf sonstige chemische Leistungen.

Er bildet weder Indol noch H₂S.

Pathogenität.

Einem jungen Meerschweinchen im Gewichte von 160 g wurden 5 ccm einer 7 Tage alten Milchkultur per os einverleibt. Das Tier zeigte keine Krankheitserscheinungen.

Versuch einer Identifizierung.

In der Literatur sind bisher, wenn man absieht von jenen fadenziehenden Bakterienrassen oder -varietäten, deren Stammformen diese Eigenschaft nicht besitzen, 17 Mikroben beschrieben worden, denen in stärkerem oder geringerem Grade die Fähigkeit zukommt, die Milch fadenziehend zu machen. Es sind dies:

1. *Actinobacter dulait visqueux* Duclaux.
2. *Actinobacter polymorphus* Duclaux.
3. *Bacillus lactis pituitosi* Löffler.
4. und 5. *Bacillus viscosus* I und II van Laer.
6. *Bacterium Hessi* Guillebeau.
7. *Bacillus lactis viscosus* Adametz.
8. *Bacterium lactis longi* Troili-Petersson.
9. *Bacillus lactorubofaciens* Gruber.
10. *Micrococcus lactis pituitosi* Schmidt.
11. *Micrococcus Freudenreichii* Guillebeau.
12. *Micrococcus* der langen Wei Weigmann.
13. *Micrococcus mucilaginosus* Migula-v.Ratz.
14. *Diplococcus liodermus* Schütz-v.Ratz.
15. *Micrococcus Hueppe*.
16. *Karphococcus pituitoparus* Hohl.
17. *Coccus lactis viscosi* Gruber.

Bei einem Vergleich dieser Organismen mit dem von uns aus Milch isolierten Coccus fallen zunächst alle jenen Mikroben außer Betracht, die die typische Stäbchenform besitzen; es gehören hierher, die oben unter 1–9 aufgeführten Arten. Von den Kokken unterscheiden sich infolge Fehlens eines proteolytischen Enzyms die unter Rubrik 10, 12, 13, 14, 15 und 16 eingereihten Mikroben. Das Vermögen, Gelatine zu verflüssigen, besitzen außer unserem Coccus nur *Micrococcus Freudenreichii* und *Coccus lactis viscosi*. Während nun aber bei diesen Organismen die Verflüssigung der Gelatine schon innerhalb 24 resp. 72 Stunden erfolgt, tritt sie bei unserem Coccus erst nach 25 und mehr Tagen ein. *Micrococcus Freudenreichii* besitzt außerdem eine Größe von 2 μ und sein Temperaturoptimum liegt bei 20° C, beides Momente, die, verglichen mit denen des vorliegend beschriebenen Coccus, verschieden sind. Morphologisch besteht eine große Ähnlichkeit zwischen dem Gruberschen und dem unserigen Organismus, indem bei beiden die Tetradenform häufig zu beobachten ist. Neben dem bereits erwähnten, sehr verschieden stark ausgebildeten proteolytischen Enzym der beiden, unterscheiden sie sich auch noch in ihrem Sauerstoffbedürfnis. *Coccus lactis viscosi* wächst besser bei Sauerstoffabschluß, während jener wesentlich kräftigeres und schnelleres Wachstum zeigt bei ungehindertem Luftzutritt. Verschieden voneinander ist ferner ihr Wachstum auf Gelatineplatten. Der Grubersche Coccus bildet unregelmäßige, zerrissene, papierstückchenähnliche Kolonien, während der unserige runde Kolonien aufweist.

Aus diesen Ausführungen ergibt sich, daß eine Identifizierung des von uns isolierten, Milch fadenziehend machenden Coccus mit den bisher bekannten Erregern der schleimig-fadenziehenden Milch nicht möglich war, weshalb wir uns für berechtigt halten, ihn als eine neue Art anzusehen. Wir schlagen daher vor, ihn *Micrococcus mucofaciens* zu benennen.

Literaturverzeichnis.

- v. Freudenreich, Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft. 3. Aufl. Jena (Gust. Fischer) 1906.

- L a f a r, F., Handb. d. techn. Mykol. Bd. 2. Jena (Gust. Fischer) 1908.
 H o h l, J., Ein neuer, aus Stroh isolierter, das „Fadenziehen“ der Milch verursachender Coccus. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1902. p. 342.)
 G r u b e r, Th., Beitrag zur Kenntnis der Erreger der schleimigen und fadenziehenden Milch und Charakterisierung des *Coccus lactis viscosi*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. 2. Bd. 9. 1902. p. 785.)

Nachdruck verboten.

Über Actinomyceten des Bodens.

I. Mitteilung.

[Aus der Agrik.-chem. Versuchsstation Halle a. S., Vorsteher
 Prof. Dr. W. Schneidewind.]

Von Dr. F. Münter.

Mit 3 Tafeln und 3 Textfig.

Von den Actinomyceten oder Strahlenpilzen erregen einige in Boden lebende Interesse durch Erzeugung eines intensiven Erdgeruches. Da sie ferner eine Verbindungsgruppe zwischen Bakterien und Pilzen zu sein scheinen, lag eine Untersuchung ihrer noch nicht klargelegten Lebensbedingungen und Eigenschaften nahe.

Zur Untersuchung kamen sieben Actinomyceten verschiedener Böden. *Actinomyces odorifer* und *chromogenes* wurden aus dem Lößlehm Boden der Versuchswirtschaft Lauchstedt bei Halle, *Act. albus I* dem Sandboden der Versuchswirtschaft Groß-Lübars isoliert. Eine ähnliche Art entstammt dem Boden von Asti (Ober-Italien) und ist als *Act. albus II* bezeichnet. Drei weitere Formen befanden sich in einem Sandboden der Plantagen der ostafrikanischen Gesellschaft „Südküste“ bei Lindi und sind als *Actinomyces S. a.*, *Act. S. b.* und *Act. S. c.* aufgeführt. Als kurze Charakteristik mag erwähnt werden, daß *Act. odorifer* einen intensiven Erdgeruch erzeugt und seine Luftsporen auch im Alter weiß bleiben. *Act. albus I*, *Act. albus II* und *Act. S. c.* sind sich ziemlich ähnlich, erzeugen nur schwachen oder keinen Erdgeruch und die weiße Farbe ihrer Gonidien geht leicht in grau, blaugrau oder eine ähnliche Nuance über. *Act. S. a.*, ebenfalls meist ohne Erdgeruch, bildet weiße bis gelbliche Sporen. Die Kolonien erzeugen in ihrer Mitte häufig einen gelblichen, wasserlöslichen Farbstoff. Dieser *Actinomyces* zeigte stets die regste Lebensfähigkeit. Färbten die soeben genannten Lebewesen Gelatinekulturen nicht, so riefen *Actinomyces chromogenes* und *S. b.* intensive Braunfärbung hervor. Beide zeigen gewöhnlich träges Wachstum, keimen schlecht an, bilden meist speckglänzende, feuchte Kolonien und erzeugen schwer Luftsporen. Während aber ersterer einen schwachen Erdgeruch hervorruft, riechen die *Act. S. b.*-Kulturen intensiv nach Wacholder. Dieses Verhalten ist wohl bei keinem andern Actinomyceten bekannt.

Sämtliche Flüssigkeitskulturen wurden in Erlenmeyer-Kolben mit 50 oder 100 ccm Nährlösung angesetzt, Agar- und Gelatinekulturen in Petri-Schalen, Sandkulturen mit 50 g durch Salzsäure gereinigten, mit destilliertem Wasser gewaschenen Sand (Saalsand bis 2 mm) in Erlenmeyer-Kolben unter Zugabe von 10–15 ccm Nährlösung.

Bei sämtlichen Tabellen bedeutet 0 ohne Vegetation, 1 spärliches, 2 mäßiges, 3 mittleres, 4 gutes, 5 sehr gutes Wachstum.

1. Wachstum auf Agar und Gelatine.

Da zur Isolierung der Actinomyceten Agar-Gelatineplatten benutzt wurden, sollten zuerst die Lebensverhältnisse auf diesen Substanzen festgestellt werden.

a) Das Nährsubstrat für die Agarplatten bestand aus 1000 ccm Wasser, 10 g Dextrose, 2 g Mannit, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 2 g K_2HPO_4 , 1,5 g NH_4NO_3 , 0,1 g $CaCl_2$, Spur $FeCl_3$, 12 g Agar, mit Na_2CO_3 schwach alkalisch gemacht. Der erste Versuch stand 20 Tage bei gewöhnlicher Stubenwärme im Januar und Februar 1911, der zweite im August 1911 unter denselben Bedingungen.

Actinomyces odorifer erzeugte fettglänzende, feuchte Kulturen mit stellenweiser Bildung weißer Luftsporen. Agar wurde nicht verflüssigt. Starker Erdgeruch.

Act. chromogenes bildete in den ersten Kulturen fettglänzende, feuchte weiß-rosa bis rote Kolonien ohne Luftmycel oder Erdgeruch. Die Augustkulturen zeigten weiße, fettglänzende Kolonien mit weißen Gonidien, aber ebenfalls keinen Erdgeruch und keine Agarverflüssigung.

Die anfangs fettglänzenden feuchten Kulturen von *Act. albus I* zeigten allmählich Luftmycel mit weißen Sporen, deren Farbe später in grau oder grauschwarz überging. Erdgeruch war nur schwach bemerkbar, dagegen keine Einwirkung auf Agar.

Act. albus II verhielt sich wie *albus I*, jedoch fehlte jeglicher Erdgeruch.

Act. S. a. bildete trockene, farblose Kolonien, deren Unterschicht mit einem löslichen gelblichen bis gelben Farbstoff durchtränkt war. Luftmycel mit weißen Sporen wurde stets sehr reichlich gebildet. Dieses Lebewesen neigte am stärksten dazu, die Ausbildung der Luftsporen in ringförmiger Anordnung hervorzurufen (Abb. Taf. III 1). Selten Erdgeruch, keine Agarverflüssigung.

Sehr träge gestaltet sich meist das Wachstum des *Actinomyces S. b.* Seine weißen fettglänzenden oder schmutzig gelblichen, feuchten und faltigen Kolonien bildeten nur schwer Gonidien, erzeugten keinen Geruch und griffen Agar nicht an.

Act. S. c. scheint auf Agar schlechter als *albus* zu wachsen. Er bildete weiße, feuchte Kolonien mit meist keinem oder spärlichem weißen Sporenbelag; ohne Geruch und Agarumsetzung.

Um das Leben der Actinomyceten bei längerer Dauer festzustellen, wurden von demselben Nährboden schräg erstarrte Reagensrohrkulturen hergestellt, die nach vierwöchentlichem Wachstum mit Paraffin zugeschmolzen wurden. Nach sieben Monaten zeigten *Actinomyces albus*, *S. a.*, *S. b.*, *S. c.* und *albus II* starke Sporendecken, die ersten drei unter Ringbildung. *Act. odorifer* und *chromogenes* erzeugten nur feuchte, fettglänzende Kolonien ohne Gonidien, die vor allem bei *chromogenes* Ringbildung des Mycels ausprägten. *Act. S. a.*, *S. c.*, *albus II* veränderten den Agar nicht, *Act. chromogenes* und *S. b.* färbten ihn nach vier Monaten bräunlich, *Act. odorifer* dagegen braun.

b) Der Gelatinenährboden enthielt dieselbe Zusammensetzung wie bei den Agarkulturen, nur wurde statt 12 g Agar 150 g Gelatine verwandt. Die Wachstumszeit war ebenfalls dieselbe.

Actinomyces odorifer bildet farblose Kolonien mit reichem Luftmycel und Sporen, verflüssigt Gelatine ohne Färbung. Starker Erdgeruch.

Act. chromogenes verflüssigt Gelatine langsam unter Bräunung, wächst in farblosen, wasserklaren, stark runzeligen Kolonien ohne Sporenbildung oder mit reichen Gonidien in ringförmiger Anordnung. Erdgeruch nicht wahrnehmbar.

Act. albus I erzeugte weiße, feuchte Kulturen, die später weiße Luftsporen hervorriefen, welche sich allmählich grau bis schwarzgrau färbten. Gelatine wird ohne Farbenänderung verflüssigt.

Act. albus II verhielt sich ganz wie I, nur geschah die Umsetzung der Gelatine bedeutend schneller.

Das regste Leben zeigte wieder *Act. S. a.* mit seinen weißen, auf dem Nährsubstrat durch einen wasserlöslichen Farbstoff stark gelb gefärbten Mycel. Die überaus reichlich gebildeten weißen Gonidien nahmen im Alter einen gelben Schein an. Gelatine wurde wie bei *albus* umgesetzt. Sanken die Kolonien in die verflüssigte Gelatine, färbte sich das ganze Mycel gelb. Erdgeruch nicht zu bemerken.

Act. S. b. verhält sich ganz wie *chromogenes*, bräunt Gelatine schnell und verflüssigt sie langsam, riecht aber intensiv nach Wacholder. Wie verschieden die Actinomyceten auf gleich zusammengesetzten Nährböden wachsen können, möge die Abbildung von *S. b.* in Reagensröhren zeigen. Die stark faltigen, sporenlosen Kolonien wurden auf Agar-Gelatine im Sommer 1911 erzeugt, die kleinen mit reichlicher Sporenbildung auf demselben Nährboden im März 1912.

Act. S. c. wuchs in schwach gelblichen, fettglänzenden, faltigen Kulturen, die später weiße Gonidien bildeten. Erdgeruch nicht bemerkbar. Gelatineverflüssigung ohne Farbenänderung.

Actinomyces odorifer begann die Dauerkulturen nach vier Monaten braun zu färben, so daß zwischen *chromogenes* und *odorifer* nach sieben Monaten darin kein Unterschied mehr bestand. *Act. albus*, *S. a.* und *S. c.*-Kulturen blieben weiß, *albus II* schwach braun.

Sämtliche Gelatine oder Agarstichkulturen zeigten nur an der Oberfläche Wachstum.

Fassen wir das Hauptergebnis zusammen, so finden wir, daß keine Agarkultur verflüssigt wurde, Färbung kaum eintrat, Gelatine dagegen von sämtlichen Actinomyceten, am langsamsten von *chromogenes* und *S. b.* umgesetzt wurde. Chinonbildung trat nur bei *chromogenes* und *S. b.* ein.

Tafel I zeigt in der oberen Abbildung vierzehntägige Agarkulturen, von links nach rechts genannt, *Act. odorifer*, *chromogenes*, *albus I*, *S. a.*, *S. b.*, *S. c.*, *albus II*. Die untere Abbildung Agar-Gelatinekulturen in derselben Reihenfolge. Wachstumszeit März 1912.

Tafel II zeigt Agar-Gelatinekulturen mit aufgeimpften Actinomyceten. 1 *Act. odorifer*, 2 *Act. albus I*, 3 *Act. S. a.*, 4 *Act. S. c.*, 5 *Act. chromogenes*. 6 *Act. S. b.*

Tafel III gibt die ringförmige Anordnung der Luftsporen bei *Act. S. a.* (Abb. 1)

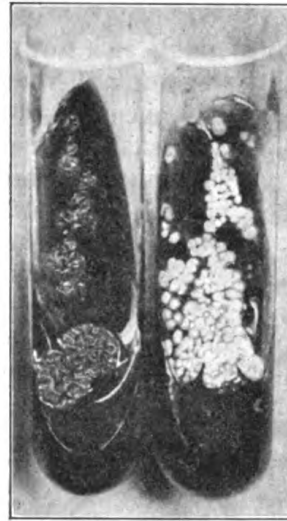


Fig. 1. *Actinomyces S. b.* auf gleichem Nährboden.

und *Act. albus I* (Abb. 2) auf Agarnährboden gut zu erkennen. Sämtliche untersuchten Actinomyceten sind befähigt Ringbildung hervorzurufen.

2. Ausnutzung anorganischer Stickstoffformen.

Es sollte nun untersucht werden, welche anorganische Stickstoffform den Actinomyceten zusagt, um für die weiteren Versuche eine kohlenstofffreie Stickstoffquelle benutzen zu können. Zum Vergleich kam neben Natriumnitrat und Ammoniumchlorid Asparagin zur Verwendung und zwar 0,002 und 0,01 g Stickstoff pro 100 ccm Nährlösung. Diese war zusammengesetzt aus 1000 ccm H_2O , 2 g Mannit, 10 g Dextrose, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g $NaCl$, 2 g K_2HPO_4 , 0,1 g $CaCl_2$ und Spur Eisenchlorid. Für Flüssigkeitskulturen kamen 100 ccm Nährlösung zur Verwendung, bei Sandkulturen auf 50 g Sand 12 ccm Lösung. Für Petri-Schalenversuche 1,2 Proz. Agar.

Das Wachstum währte für die Lösungen vom 21. Januar bis 2. Februar, für die Agarkulturen vom 2. bis 15. November, bei den Sandkulturen vom 15. bis 30. November 1911.

Es zeigte sich nun, daß die Actinomyceten in stickstofffreiem Nährboden nicht oder nur äußerst spärlich zu wachsen vermögen, die großen Stickstoffgaben dagegen die beste Vegetation hervorriefen. Ein Unterschied zwischen den drei Stickstoffformen trat nicht hervor. Siehe Tabelle 1.

Noch einige Bemerkungen über das Wachstum bei den hohen Stickstoffgaben mögen folgen.

Act. odorifer wuchs stark an und behielt auch im Alter seine weißen Sporen.

Act. chromogenes nutzte alle Stickstoffformen gut aus, das Mycel zeigte stets einen rötlichen Schein. Die Agarkulturen, hauptsächlich bei Salpeter, entwickelten zwischen den Kolonien einen intensiv roten Farbstoff, der allmählich in braun überging.

Sehr gutes Wachstum zeigte auch *Act. albus I*. Bei sehr starkem Luftmycel trat kräftige Gonidienbildung ein, deren weiße Farbe bei Salpeter meist in schwarzgrau, bei Ammon in grau und Asparagin in grüngrau überging.

Act. albus II erzeugte bei guter Entwicklung weiße bis graue Sporen.

Auch *Act. S. a.* entwickelte sehr schnelles und gutes Wachstum weißgelblicher Kolonien mit bei Salpeter weißen, Ammon gelblichen und Asparagin gelbgrauen Sporen. Es soll damit nun nicht gesagt sein, daß diese Farbnancen je nach der Stickstoffform immer eintreten müßten. Die Flüssigkeitskulturen zeigten eine intensiv gelbe Färbung.

Act. S. b. wuchs wieder langsam an, entwickelte aber vor allem bei Salpeter und Asparagin im Stadium der Sporenbildung intensiven wacholderartigen Geruch.

Act. S. c. verhielt sich ganz wie *albus II*.

3. Ausnützung einiger Alkohole und Kohlehydrate als Kohlenstoffquellen.

Obwohl vorausszusehen war, daß Kohlehydrate einen guten Nährstoff abgeben würden, sollten doch eine Anzahl dieser Körper als Kohlenstoffquelle untersucht werden.

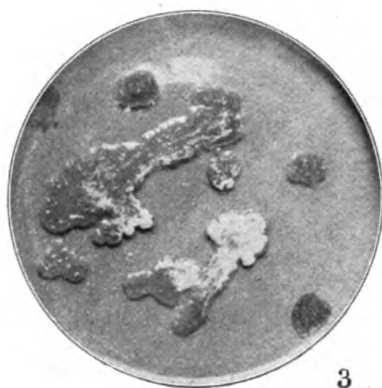
Die Nährlösung bestand bei den Flüssigkeitskulturen aus 1000 ccm H_2O , 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g $NaCl$, 0,2 g $CaCl_2$, 1 g K_2HPO_4 mit $CaCO_3$ neutralisiert, filtriert und zu jeder Kultur von 100 ccm Nährlösung 1,0 g Kohlehydrat und 0,025 g N als Ammonnitrat. Agarkulturen wie vor, unter Zusatz von



1



2



3



4



5



6

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

1,5 Proz. Agar. Bei den Sandkulturen wurden statt 1000 ccm H₂O nur 500 verwandt und zu je 100 ccm dieser Lösung 1 g Kohlehydrat und 0,025 g N wieder als Ammonnitrat gegeben. 50 g Sand wurden dann in kleinen Erlenmeyer-Kolben mit 12 ccm der fertigen Nährlösung durchtränkt.

Tabelle 1.
Ausnutzung von Salpeter-, Ammon- und organischem Stickstoff.

		Ohne Stick- stoff	Salpeter-N		Ammon-N		Asparagin-N	
			0,002 g	0,01 g	0,002 g	0,01 g	0,002 g	0,01 g
<i>Actinomyces odorifer</i>	a	0	4	4	4	5	5	5
	b	1	4	4	4	5	5	5
	c	0		5		2		5
	d	0	2	5	2	4	2	4
<i>Actinomyces chromogenes</i>	a)	Keine Kolonien, nur Sporen u. Mycelstücke						
	b)							
	c	0	5		3			5
	d	1	3	5	3	5	3	5
<i>Actinomyces albus I</i>	a	0	2	2	2	2	4	4
	b	0	2	2	2	2	4	4
	c	1		5		3		5
	d	1	3	5	3	5	3	5
<i>Actinomyces albus II</i>	a							
	b							
	c	0		5		3		5
	d	0	3	4	3	4	3	4
<i>Actinomyces S. a.</i>	a							
	b							
	c	1		5		3		5
	d	1	3	5	3	5	3	5
<i>Actinomyces S. b.</i>	a	0	1	3	3	3	3	3
	b	0	2	2	3	4	3	3
	c	0		3		3		3
	d	1	3	3	3	4	3	4
<i>Actinomyces S. c.</i>	a							
	b							
	c	0		5		3		5
	d	0	3	4	3	4	3	4

a und b Flüssigkeitskulturen, c Sandkultur, d Agarplatten.

Die Flüssigkeitskulturen a) Rohrzucker, Mannit, Galaktose, Laktose, Inulin standen vom 2.—21. März 1911, Dextrose, Arabinose, Lävulose, Glyzerin vom 31. März bis 11. Mai, b) Dextrose, Arabinose, Lävulose, Glyzerin vom 7.—15. Mai, Rohrzucker, Mannit, Galaktose, Laktose und Inulin vom 1. bis 10. Juni bei gewöhnlicher Stubentemperatur. Sandkulturen vom 20. November bis 17. Dezember; Agarschalen vom 10. bis 20. Dezember im Thermostaten bei 30°.

Wachstumsverhältnisse siehe Tabelle 2.

Demnach erwiesen sich Glyzerin, Lävulose, Dextrose, Galaktose, Mannit und Stärke als für alle Actinomyceten gute Kohlenstoffquelle, Laktose wird

nur von *Act. odorifer* nicht sicher ausgenützt, wohingegen Arabinose unsicher wirkt. Rohrzucker wird vor allem von den chinonerzeugenden Actinomycceten und *Act. S. c.* gut verwertet. Inulin scheint nur *Act. chromogenes* einen brauchbaren Nährstoff zu bieten.

Tabelle 2.
Alkohole und Kohlehydrate als Kohlenstoffquelle.

		Glycerin	Arabinose	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Laktose	Mannit	Rohrzucker	Stärke	Inulin
<i>Actinomyces odorifer</i>	a	2	4	3	1	1	3	4	2	4	2
	b	5	4	4	4	4	1	4	3	4	1
	c		2	3	3		1		1		1
	d	4		3	4		2		2		2
<i>Actinomyces chromogenes</i>	a	4	3	4	4	5	4	5	5	4	4
	b	5	3	4	4	5	4	5	4	4	4
	c		0	4	3		4		4		4
	d	5		5	3				3		5
<i>Actinomyces albus I</i>	a	4	2	4	4	5	3	5	2	4	3
	b	4	3	5	5	4	2	4	1	4	2
	c		1	4	4		3				1
	d	5		5	4		4		1		1
<i>Actinomyces albus II</i>	a	4	3	4	3	4	4	4	3	3	1
	b	4	3	4	4	3	4	2	2	4	3
	c		0	4	4		1		3		1
	d	5		5	4		4		5		2
<i>Actinomyces S. a.</i>	a	5	4	2	1	3	4	5	2	3	2
	b	4	4	4	2	4	2	5	2	3	2
	c		1	4	3		1		4		3
	d	5		5	5		3		2		2
<i>Actinomyces S. b.</i>	a	3	3	5	3	4	4	5	4	2	1
	b					5	3	3	4	4	2
	c		0	3	3		0		4		0
	d	5		5	4		5		4		3
<i>Actinomyces S. c.</i>	a	4	0	4	4	4	4	4	5	2	2
	b	4	4	4	5	4	3	4	4	3	2
	c		1	4	4		3		4		3
	d	5		4	4		2		5		4

a und b Lösungen, c Sandkulturen, d Agarplatten.

Act. odorifer zeigte in allen Kulturen mehr oder weniger Erdgeruch, die an der Oberfläche gewachsenen Kolonien trugen stets weiße Luftsporen. Allein die Mannit enthaltende Lösung nahm eine schwachgelbe Färbung an.

Act. chromogenes entwickelte ebenfalls stets Erdgeruch, auch behielten die Luftsporen im Alter ihre weiße Farbe, während die Kolonien in Gegenwart von Glycerin, Dextrose, Galaktose, Rohrzucker, Inulin und Stärke rosa, Mannit, Galaktose und Inulin gelblich oder weiß bei Arabinose,

Laktose und Inulin aussahen. Nur Galaktose bildete bei diesen Versuchen stets fettglänzende, feuchte Massen ohne Luftsporen.

Act. albus I vermochte in allen Kulturen Erdgeruch, farblose Kolonien, weiße im Alter grau bis schwarzgrau werdende Sporen zu erzeugen.

Act. albus II. scheint nur sehr schwachen Erdgeruch zu produzieren. Bei mäßigem Wachstum blieben die Luftsporen weiß, bei starker Ausbildung ging die weiße Farbe bald in grau über. Nur bei Galaktose nahmen die sonst weißen Mycelmassen einen gelben Glanz an.

Der meist sehr unsicher zu bestimmende Erdgeruch der *Act. S. a.*-Kulturen trat bei Gegenwart von Mannit stark hervor. Auch der stets gebildete wasserlösliche gelbe Farbstoff kam bei den Lösungen der Mannitgefäße am intensivsten zur Erscheinung. Die weißen Luftsporen erhielten bei gutem Wachstum allmählich einen gelblichen Glanz, nur Arabinose und Stärke färbten die Gonidien bei einem Flüssigkeitsversuch graugelb. Auch bei diesen Versuchen zeigte *Act. S. a.* wieder das schnellste Wachstum.

Sehr langsam entwickelten sich dagegen die *Act. S. b.*-Kulturen, bei einzelnen Parallelgefäßen nur Mycelenden und runde Sporen in der Flüssigkeit. Die Kolonien blieben bis auf Laktose, welches gelblichrotes und Rohrzucker weißlichgelbes Mycel erzeugte, farblos. Die Gonidien behielten stets ihre weiße Färbung. Mit gutem Wachstum stand stets starker Wacholdergeruch im Einklang.

Die *Act. S. c.*-Kulturen blieben meist weißlich, in Anwesenheit von Mannit wurden sie teils rosa, von Galaktose und Laktose gelblich gefärbt. Die weißen Luftsporen gingen bei guter Ernährung regelmäßig in grau oder dunkelgrau über. Erdgeruch war stets nur schwach und unsicher zu bestimmen.

4. Verwertung des Kohlenstoffs organischer Säuren.

Da auch Salze organischer Säuren den Actinomyceten im Boden zur Verfügung stehen, sollten nun einige Säuren auf die Ausnutzungsfähigkeit als Kohlenstoffquelle untersucht werden. Die Säuren kamen als Natrium und Kalksalze zur Verwendung.

Nährlösung für Flüssigkeitskulturen: 1000 ccm dest. Wasser, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 1,0 g K_2HPO_4 und pro Gefäß mit 50 ccm dieser Nährlösung 0,0353 g Ammonnitrat = 0,025 Proz. N und 0,25 g Säure, alles mit Na_2CO_3 schwach alkalisch gemacht. Bei den Kalkversuchen wurde statt mit Na_2CO_3 zu neutralisieren, pro Gefäß 2 g $CaCO_3$ zugesetzt. Bei den Sandversuchen kam wieder auf die oben angegebenen Salzmengen nur 500 ccm H_2O zur Verwendung. Davon wurden 100 ccm zu 0,8 g Säure gegeben mit Na_2CO_3 eventuell unter Erwärmen schwach alkalisch gemacht und pro 50 g Sand 12,5 ccm Lösung = 0,1 g Säure benutzt.

Die Agarkulturen enthielten 1000 ccm H_2O , 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 1,5 g K_2HPO_4 , 1,5 g Ammonnitrat, 0,2 g $CaCl_2$, Spur $FeCl_3$, 1,25 Proz. Agar und pro 100 ccm dieser Agarlösung 1 g Säure mit Na_2CO_3 neutralisiert, resp. schwach alkalisch gemacht.

Dauer der Natriumsalzkulturen: Flüssigkeit 1 vom 18. März bis 26. April, 2 vom 6. Mai bis 1. Juni 1911, Sand vom 1. bis 20. Dezember 1911, Agarplatten vom 23. Dezember 1911 bis 14. Januar 1912, Kalksalzgefäße vom 2. Juni bis 15. Juli 1911. Sämtliche Kulturen standen bei Stubentemperatur.

Tabelle 3 zeigt die Wachstumsergebnisse. Danach kommen Oxalsäure, Weinsäure und Hippursäure als Kohlenstoffquelle nicht in Betracht. Chemisch behandelte Humussäure (bezogen von Merk) bot ebenfalls einen äußerst

schlechten Nährboden. Bernsteinsäure und Zitronensäure gaben für sämtliche Actinomyeten einen sicheren, guten Nährstoff ab, auch einigermaßen für Act. S. b., welcher Säuren scheinbar recht schlecht zu verwerten versteht. Mit dem Eintritt von Oxygruppen in die Bernsteinsäure verringert sich deren Ausnutzbarkeit, denn schon bei der Apfelsäure vermindert sich das Wachstum, welches bei Weinsäure ganz aufhört. Der Eintritt einer Amidogruppe (Asparaginsäure) verändert den Nährwert kaum. Milchsäure bietet jedoch, trotz der Oxygruppe, einen guten Nährboden, Essigsäure ist eben-

Tabelle 3.
Organische Säuren als Kohlenstoffquelle.

			Essigsäure	Milchsäure	Oxalsäure	Bernsteinsäure	Apfelsäure	Weinsäure	Asparaginsäure	Zitronensäure	Hippursäure	Ursäure	Humussäure
Actinomyces odorifer	a	Na		5	0		0	0	4	1	1		1
	b	„	0	0	0		0	0	4	3	0	2	1
	c	„	2	3		4	1	0	3	4	0	1	0
	d	„	4	5		3	3		3	4	0	1	0
	e	Ca	4	4	0	5	4	1	4	5	1	2	1
Actinomyces chromogenes	a	Na		4	0		1	0	0	0	0		0
	b	„	0	0	0		0	0	4	3	0	4	2
	c	„	3	3		4	1	0	1	4	0	1	0
	d	„	4	2		3	1		3	4	0	1	0
	e	Ca	4	2	1	5	4	1	3	4	1	4	1
Actinomyces albus I	a	Na		4	0		0	0	1	0	0		0
	b	„	0	0	0		0	0	3	1	0	4	2
	c	„	4	4		4	4	0	3	5	0	3	0
	d	„	5	3		3	2		4	4	0	3	0
	e	Ca	3	3	0	4	4	1	2	5	0	1	1
Actinomyces albus II	a	Na		3	0		0	0	1	0	0		0
	b	„	0	0	0		0	0	3	2	0	4	0
	c	„	3	4		4	4	0	3	5	0	3	0
	d	„	4	4		3	2		3	4	0	1	0
	e	Ca	2	3	0	3	2	1	3	2	1	3	1
Actinomyces S. a.	a	Na		5	0		1	0	4	0	0		2
	b	„	0	0	0		0	0	4	4	0	4	2
	c	„	4	5		4	4	0	3	5	0	3	2
	d	„	5	5		4	4		4	5	0	3	0
	e	Ca	1	4	0	4	3	0	4	5	1	1	1
Actinomyces S. b.	a	Na		2	0		0	0	0	0	0		0
	b	„	0	0	0		0	0	1	3	0	1	0
	c	„	1	0			0	0	1	1	0	1	0
	d	„	4	1		3	0		2	4	0	1	0
	e	Ca	1	1	0	3	1	0	1	1	0	1	1
Actinomyces S. c.	a	Na		4	0		0	0	1	0	1		0
	b	„	0	0	0		0	0	2	1	0	4	0
	c	„	3	4		4	4	0	4	4	0	2	1
	d	„	4	4		3	2		3	3	0	1	0
	e	Ca	2	3	0	3	3	1	4	4	1	3	1

a, b u. e Flüssigkeitskulturen, c Sand, d Agarplatten.

falls brauchbar. Ursäure bildete keine kompakten Kolonien, sondern auch bei gutem Wachstum dünneres, lockeres Gewebe.

Gerade bei diesem Versuche zeigten die Flüssigkeitskulturen trotz wiederholter Impfung recht unzuverlässiges Wachstum, indem die eine Parallelkultur gut, die andere oder alle gar nicht ankeimten. Diese Versuche allein würden also ein ganz falsches Bild ergeben haben, wie die Agar- und Sandkulturen bestätigten. Die Actinomycoeten zeigten nämlich die Gewohnheit, nicht an der Oberfläche sondern am Boden der Gefäße in der Flüssigkeit zu wachsen. Sie erzeugen dann meist blumenkohlartige, farblose Gebilde, deren Mycel im Alter häufig verfällt.

Zum Wachstum der einzelnen Actinomycoeten wäre zu bemerken, daß *Act. odorifer* stets weißes Mycel bildet, welches jedoch verschiedentlich wasserlösliche Farbstoffe absondert und die Nährlösungen färbt, so bei milchsaurem Kalk rosa, bernstein- und apfelsaurem Kalk, milch-, zitronen- und asparaginsaurem Natrium gelb. Die Gonidien blieben auch im Alter weiß. Erdgeruch stets vorhanden.

Auch *Act. chromogenes* entwickelt mit Farbstoff durchtränkte Kolonien, so bei bernstein-, apfel-, asparagin- und zitronensaurem Kalk, milch- und zitronensaurem Natrium gelb, asparagin- und ursäurem Natrium rosa. Die Nährlösungen nahmen stets betreffende Farbe an. Nur weiße Luftsporen und bei gutem Wachstum Erdgeruch.

Das Mycel des *Act. albus I* schied nie Farbstoffe aus, bildete bei allen Säuren farbloses Gewebe und bei besserem Wachstum weiße, später grau bis schwarzgrau werdende Luftsporen. Erdgeruch kaum zu vernehmen.

Act. albus II verhielt sich ganz wie *albus I*, nur wurde die Färbung der Gonidien nie dunkler als grau oder silbergrau.

Wie gewöhnlich entwickelte *Act. S. a.* das intensivste Wachstum. Seine Kolonien bilden bei einiger Entwicklung in allen Salzlösungen einen gelben Farbstoff, welcher Mycel und Lösung färbt. Die Abschnürung von weißlichgelben, bei zitronensaurem Kalk sogar gelbbraunen Luftsporen trat sehr schnell ein.

Act. S. b. scheint organische Säuren als Kohlenstoffquelle nur ungern zu verwerten und Luftsporen wurden nur bei einer Agarplatte mit zitronensaurem Natrium gebildet. Sämtliche Kulturen blieben geruchlos.

Act. S. c. verhielt sich wie *albus I* mit stets farblosen Lösungen, farblos weißem Mycel und weißgrauen bis grauen Sporen. Nur in hippursäuren Lösungen entstanden einige kleine rote Kolonien.

5. Organische Substanzen als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.

Es war nun Aufgabe, einige kohlenstoff- und stickstoffreiche Bakterien-nährstoffe auf ihre Ausnutzbarkeit durch die Actinomycoeten zu untersuchen. Gewählt wurden Albumin, Hemialbumin, Kasein, Asparagin, Harnstoff, Thioharnstoff, Alanin, Tyrosin und Dicyandiamid.

A) Welche von den vorgenannten Substanzen waren nun fähig, als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu dienen?

Nährlösung: 1000 H₂O, 0,5 g MgSO₄, 0,5 g NaCl, 0,1 g CaCl₂, 1,0 g K₂HPO₄, Spur FeCl₃ mit CaCO₃ neutralisiert und filtriert. 100 ccm dieser Lösung im *Erlenmeyer*-Kolben wurden je 0,5 g der zu untersuchenden Substanz zugesetzt. Versuch 1 stand vom 31. März bis 27. April, 2 vom 7. Mai bis 1. Juni, 3 vom 12. Juni bis 20. Juli 1911 bei gewöhnlicher Stubentemperatur. Wachstumsverhältnisse siehe Tabelle 4.

Tabelle 4. Organische Körper als

		Albumin	Hemi- Albumin	Kasein	Asparagin	Harnstoff		
		C u. N	C u. N	C u. N	C u. N	C u. N	C	N
Act. odorifer	Lösung	5		5	5			
	"		4	4	3	1		
	"					1		1
	Sand						0	2
	Agar						2	3
Act. chro- mogenes	Lösung	5		4	5			
	"		4	4	3	1		
	"					1		2
	Sand						0	1
	Agar						0	2
Act. albus I	Lösung	5		4	5			
	"		4	4	4	1		
	"					1		4
	Sand						0	2
	Agar						2	
Act. albus II	Lösung	5		4	5			
	"		4	4	4	1		
	"					1		5
	Sand						0	4
	Agar						2	
Act. S. a	Lösung	5		3	5			
	"		4	4	4	2		
	"					1		4
	Sand						0	4
	Agar						0	4
Act. S. b	Lösung	5		2	4			
	"		3	2	2	1		
	"					1		1
	Sand						0	2
	Agar						0	2
Act. S. c	Lösung	5		3	5			
	"		4	3	4	1		
	"					1		3
	Sand						0	2
	Agar						1	

Kohlenstoff und Stickstoffquelle.

Thioharnstoff			Alanin			Tyrosin			Dicyandiamid		
C u. N	C	N	C u. N	C	N	C u. N	C	N	C u. N	C	N
0 1		2	4 4			3 3			1		3
	0	1		3	4		3	4		0	3
	1	2		4	4		3	3		1	3
0 1		3	4 4			3 3			0		3
	0	0		4	4		4	3		0	2
	0	2		4	4		3	4		0	3
0 1		3	4 4			3 3			1		3
	0	2		4	4		2	3		0	2
	1			4			3			1	
1 1		2	3 4			4 4			1		3
	0	3		4	5		3	3		0	2
	2			4			3			1	
1 1		3	4 4			4 4			1		3
	0	3		4	5		4	5		0	3
	0	3		4	5		4	4		0	3
0 1		2	3 2			3 2			1		3
	0	0		2	3		2	3		0	1
	0	2		4	3		3	3		0	3
0 1		3	3 4			4 3			1		3
	0	1		3	4		2	3		0	2
	1			4			2			1	

Albumin, Hemialbumin, Kasein, Asparagin und Alanin gaben recht gute Nährstoffe ab, etwas geringeres Wachstum befähigte Tyrosin, während Harnstoff, Thioharnstoff und Dicyandiamid vollständig versagten.

Es zeigte sich wieder, daß *Act. S. b.* schwer wächst und meist nur kurze Mycelenden und kleine runde Zellen in der Flüssigkeit bildet.

Die Albuminnährlösungen färbten sich gelblich, bei *Act. chromogenes* und *S. b.* sogar dunkelgelb und rochen sämtlich fäulnisartig. Das Wachstum erfolgte sehr schnell und so hervorragend, daß die Oberfläche bald eine Sporendecke bildete, die bei *Act. odorifer, chromogenes, S. a., S. b.* und *S. c.* weiß, bei *Act. albus I* und *II* grau gefärbt war.

Genau dasselbe Bild lieferten die Hemialbuminkulturen, weshalb genaueres Eingehen überflüssig erscheint. *S. b.* bildete trotz des schwachen Wachstums dunkelgelbe Lösung. Geruch wurde nicht festgestellt.

Bei Kasein verminderte sich der fäulnisartige Geruch so bedeutend, daß der Erdgeruch bei sämtlichen sechs Actinomyceten wieder zum Vorschein kam; *Act. S. b.* produzierte dagegen den ihm eigentümlichen Wacholdergeruch. Die Lösungen färbten sich gelblich, bei *Act. chromogenes* und *S. b.* dunkelbraun. Rein weiße Sporendecke trat bei *Act. odorifer* und *S. a.* auf, graue bei *albus I*, weiße Sporen abwechselnd mit schwarzgrauen in ringförmiger Anordnung bei *Act. albus II* und *S. c.* *Act. albus II* bildete aber auch große speckglänzende Einzelkolonien, die am Rande einen weißen Sporenring trugen. In gleichen feuchten, aber gonidienlosen Kolonien wuchsen *Act. chromogenes* und *S. b.*

Vollständig farblos blieben die Asparaginkulturen und ebenso verschwand der Fäulnisgeruch. *Act. S. b.* bildete kräftigen Wacholdergeruch, *Act. odorifer* starken, die anderen sehr schwachen Erdgeruch. Sämtliche Kolonien waren bevor sie Sporen bildeten, mit Ausnahme von *Act. S. a.*, welcher gelbes und gelbgraues Mycel entwickelte, farblos. *Act. odorifer, chromogenes, S. a.* und *S. b.* trugen weiße, *albus I* und *II*, sowie *S. c.* graue bis schwarzgraue Gonidien.

Die bisher beschriebenen Substanzen wurden wegen ihrer guten Nährfähigkeit nicht weiter untersucht.

Act. odorifer, albus I und *II, S. c.* zeigten in den Alaninkulturen genau dasselbe Verhalten wie in den Asparaginlösungen. *Act. chromogenes* färbte dagegen sein Mycel rosa, behielt aber weiße Sporen, in Parallelgefäßen bildete er wieder fettglänzende, feuchte Kolonien mit weißem Sporenrande. Gelblichweiße Kolonien mit gleichgefärbten Gonidien erzeugte *Act. S. a.*, wohingegen *Act. S. b.* nur ein farbloses, dünnes, lockeres Mycel mit weißen Sporen entwickelte.

Waren die Lösungen bei Alaninzusatz gar nicht oder kaum gefärbt, so zeigten sämtliche Tyrosinkulturen eine rotbraune Farbe, die sich bei *Act. chromogenes* und *S. b.*, wo sie sehr schnell auftrat, zu dunkelbraun verstärkte. Weiße Sporen wurden bei allen Gefäßen nur spärlich gebildet, *Act. S. b.* wuchs nur am Boden.

Dicyandiamid erzeugte nur am Boden der Kolben wenige kleine Kolonien und dünne Mycelfäden. Harnstoff und Thioharnstoff versagten ebenfalls.

B. Es fragte sich nun, ob der Kohlenstoff oder Stickstoff die schlechte Ausnutzbarkeit verursachten, oder ob die geprüften Körper überhaupt nicht fähig waren, als Nährstoff zu dienen? Zuerst wurde die Verwendbarkeit des Kohlenstoffs untersucht.

Nährlösung: 1000 H₂O, 0,5 g MgSO₄, 0,5 g NaCl, 0,2 g CaCl₂, 1,5 g K₂HPO₄, 1,5 g NH₄NO₃, Spur FeCl₃, mit Na₂CO₃ schwach alkalisch gemacht. Auf 100 ccm dieser Lösung kamen 0,5 g der zu untersuchenden Substanz, davon 12 ccm auf 50 g Sand. Die Agarkulturen enthielten auf dieselben Mengenverhältnisse 1,2 Proz. Agar. Die Sandkulturen wuchsen vom 20. Dezember 1911 bis 2. Januar 1912, Agarkulturen vom 6. bis 20. Januar 1912 bei gewöhnlicher Stubentemperatur.

Ein Vorversuch zeigte, daß Agar den Actinomyceten keine Kohlenstoffquelle bietet.

Wie Tabelle 4 ausführt, vermochten nur Alanin und in schwächerem Grade Tyrosin ausgenutzt zu werden.

C. Hatten die Versuche unter B bewiesen, daß infolge der Unverwendbarkeit des Kohlenstoffes die bisher versagenden Substanzen nicht ausgenutzt werden konnten, so war jedoch nicht ausgeschlossen, daß ihr Stickstoff verwertet werden konnte.

Die Nährflüssigkeit bestand aus 1000 H₂O, 0,5 g MgSO₄, 0,5 g NaCl, 1,5 g K₂HPO₄, 0,1 g CaCl₂, Tropfen FeCl₃, 10 g Dextrose, 2 g Galaktose und pro Gefäß (50 ccm dieser Lösung) 0,25 g organische Substanz. Die Sandkulturen bekamen statt Galaktose 5 g Glyzerin und auf 50 g Sand 12 ccm Nährlösung und 0,1 g des zu untersuchenden Körpers. Agarkulturen enthielten 1,2 Proz. Agar in Sandkulturnährlösung und auf je 10 ccm 0,05 g organische Substanz.

Die Lösungen standen vom 12. Juni bis 20. Juli 1911, die Agarplatten vom 10. bis 25. Januar 1912 bei gewöhnlicher Temperatur, die Sandkulturen vom 5. bis 10. Januar im Thermostaten bei 25°, dann noch bis zum 22. Januar bei Zimmertemperatur.

Alanin und Tyrosin zeitigten wieder dieselben Verhältnisse.

Harnstoff bietet *Act. albus* I und II, sowie *S. a.* eine gute Stickstoffquelle, die anderen Actinomyceten vermögen ihn nur mäßig zu verwerten. *Act. albus* II und *S. c.* bildeten große Einzelkolonien mit grauen, *S. a.* mit weißen Gonidien. *Act. albus* I erzeugte speckglänzende feuchte Kolonien mit weißem Sporenrande.

Thioharnstoff wirkt im günstigsten Falle mittelmäßig. *Act. albus* I vermochte zwar fettglänzende Kolonien zu bilden, die aber keine Sporen abschnürten. In den Flüssigkeitskulturen wuchsen sämtliche anderen Actinomyceten nur am Boden der Gefäße als kleine schwammige Gebilde.

Dicyanamid vermochte stets nur ein lockeres, zartes Mycelgewebe mit spärlicher Sporenbildung an der Oberfläche zu erzeugen oder wie bei einigen Kulturen von *Act. chromogenes*, *albus* I und *S. a.* große, schwammige, farblose Kolonien am Boden der Gefäße. Dicyandiamid ist also fähig, die Actinomyceten im Notfalle mit Stickstoff zu versehen.

Es muß hier bemerkt werden, daß sämtliche Agarkulturen bei Gegenwart von Tyrosin weiß blieben und nicht die geringste Färbung auftrat. Versehentlich wurde ein Stickstoffversuch mit Agar und Gelatine angesetzt. Es zeigte sich nun, daß die mit *Act. chromogenes* und *S. b.* geimpften Platten eine von den entstandenen Kolonien ausgehende tiefschwarze Färbung erzeugten, welche sich allmählich über die ganze Kultur verbreitete. (Siehe Tafel III, Abb. 3, *Act. S. b.*, 4 *Act. albus* I.)

Die Versuche haben also ergeben, daß bei Harnstoff, Thioharnstoff und Dicyandiamid der Stickstoff ausgenutzt werden kann, der Kohlenstoff jedoch unverwendbar ist.

6. Einfluß verschiedener Säuregrade auf das Wachstum.

Bisher wurden sämtliche Versuche in alkalisch oder neutral reagierenden Nährsubstraten ausgeführt. Da die Actinomyceten auch in schwach saurem Boden leicht leben, sollte geprüft werden, bis zu welchem Säuregrade sie zu wachsen befähigt sind. Es wurden Essigsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure und Asparaginsäure verwandt.

Die Nährlösung enthielt auf 1000 ccm H_2O , 0,5 g NaCl, 0,5 g $MgSO_4$, 0,1 g $CaCl_2$, 1,5 g K_2HPO_4 , 1,0 Ammonnitrat, 0,5 g Asparagin, 9 g Dextrose, 1 g Mannit, mit Na_2CO_3 möglichst neutralisiert. Pro kleinem Erlenmeyerkolben 50 ccm Nährlösung. Über die Säureverhältnisse gibt die Tabelle 5 an, wieviel Prozent der verschiedenen Säuren zugesetzt wurden, wieviel Prozent, berechnet zum Vergleich auf Essigsäure, nach dem Sterilisieren noch vorhanden waren und wieviel Prozent am Schlusse des Versuchs titriert wurden. Der Strich an den Zahlen deutet die Stelle des Wachstums an, z. B. 4[—] heißt, daß gutes Wachstum an der Oberfläche der Flüssigkeit erfolgte, 3— dagegen mittlere Vegetation am Boden des Gefäßes, also in der Flüssigkeit.

Die Kulturen 1 standen vom 1. bis 28. April 1911, 2 vom 7. bis 20. August, 3 vom 30. August bis 30. September 1911 bei gewöhnlicher Stubentemperatur.

Wie Tabelle 5 zeigt, vertragen die Actinomyceten einen schwachen Säuregehalt. Doch schon bei einem Zusatz von 0,01 Proz. Apfelsäure und 0,1 Proz. Essigsäure versagt jegliches Wachstum. Bernsteinsäure und Asparaginsäure verhindern langsamer die Vegetation. Eine Eigentümlichkeit trat auf, indem bei zunehmendem Säuregehalt die Actinomyceten ihr Wachstum allmählich von der Oberfläche der Nährlösung auf den Boden des Gefäßes verlegten. *Act. albus* I allein zeigte stets Oberflächenwachstum, dagegen wuchsen *odorifer*, *chromogenes* und *S. c.* bei der geringsten Säuregegenwart in der Nährlösung in blumenkohlartigen Gebilden und erzeugten natürlich keine Luftsporen, sondern das Mycel zerfiel in verschiedene große Enden, Stäbchen oder kleine runde Zellen, Mycelhülsen zurücklassend. *Act. S. b.* zeigte meist Bodenwachstum, bei Säuregehalt sehr schnell zerfallendes Mycel, so daß fast immer nur Mycelenden in den Kulturen vorhanden waren. Mikroskopisch zeigten sich in keiner Kultur Sonderheiten.

Der Erdgeruch war, sobald Wachstum eintrat, immer vorhanden, er scheint also kaum vom Säuregehalt abhängig zu sein. *Act. S. b.* erzeugte wieder, trotzdem nie Gonidien gebildet wurden, den charakteristischen Wacholdergeruch.

Wie das Mycelwachstum, so erleidet auch scheinbar die Ausbildung und Reifung der Luftsporen eine Verzögerung. Bei neutraler Reaktion der Nährlösung zeigte *Act. albus* I weiße, später graue bis schwarzgraue, *Act. S. a.* weiße, dann gelblich werdende Gonidien. Bei Gegenwart von Säure vermochten diese Actinomyceten ihre Sporen nicht mehr umzufärben. Vielleicht verhindert die Säure auch nur die Bildung des Farbstoffes.

Da die Actinomyceten recht empfindlich gegen Säuren sind, hätte man erwarten sollen, daß sie versuchen würden, die Nährlösungen möglichst zu neutralisieren. Dies trat aber nicht ein, sondern sie bildeten sogar in den neutralen und schwach sauren Lösungen Säuren, scheinen mithin bei diesen Versuchen ihre Nahrung auf einen bestimmten Säuregrad (ca. 0,02—0,06 Proz. Essigsäure) einzustellen, oder, da die Möglichkeit einer Neutralisation der gebildeten Säure in deren Nährsubstrat nicht vorhanden war, bis zu einem bestimmten Säuregrad zu wachsen.

Tabelle 5. Einfluß verschiedener Säuregrade.

		Essigsäure			Bernsteinsäure				Äpfelsäure				Asparaginsäure						
		neu- tral	0,01	0,1	neu- tral	0,004	0,04	0,1	neu- tral	0,004	0,01	0,04	0,1	neu- tral	0,01	0,05	0,1	0,2	0,4
zusetzte Säure %																			
Säuregehalt nach Sterilisation in % Essigsäure			0,014	0,1		0,016	0,064			0,016		0,08			0,016		0,068		
Act. odorifer	1								4—		0			4—	3—	0		0	
	2							0	5—					3—			1—		
	3	4—	3—	0		3—	2—		4—	4—				3—	3—				
Gef. Säure i. % Essigs.		3	0,060											0,040					
Act. chromogenes	1								3		0			4—	4—	2—		0	
	2							0	1—					1—			1—		
	3	2—	1—	0		3—	3—		3—	3—				3—	3—				
		3	0,032			0,050				0,040					0,048		0,072		
Act. albus	1								4—		0			4—	4—	3—		0	
	2							0	1—					1—			3—		
	3	4—	4—	0		4—	3—		5—	5—				4—	4—				
		3					0,032			0,024					0,050		0,028		
Act. albus II	1								4—		0			4—	4—			0	
	2							0	1—					3—			3—		
	3	4—	3—	0		2—	1—		4—	1—				3—	3—				
		3	0,032			0,048	0,062			0,030				0,020			0,028		
Act. S. a	1								4—		0			4—	4—	2—		0	
	2							0	5—					5—			2—		
	3	4—	3—	0		4—	2—		4—	3—				5—	4—				
		3	alk.			0,036	0,068			0,028				0,080			0,038		
Act. S. b	1								4—		0			4—	4—	3—		0	
	2							0	4—					3—			1—		
	3	2—	1—	0		1—	1—		2—	1—				2—	1—				
		3				0,028	0,058		0,009	0,036				0,032	0,048		0,068		
Act. S. c	1								4—		0			4—	4—	3—		0	
	2							0	1—					3—			1—		
	3	3—	0	0		3—	3—		1—	1—				3—	3—		3—		
Gef. Säure i. % Essigs.		3				0,064	0,068			0,044							0,064		

7. Einfluß verschiedener Alkalitätsgrade auf das Wachstum.

Da die vorhergehenden Versuche zu zeigen scheinen, daß die Actinomycceten einen gewissen Säuregrad vertragen, mußte auch ihr Verhalten in alkalischer Nahrung geprüft werden.

Die Nährlösung bestand aus 1000 ccm Wasser, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 0,1 g $CaCl_2$, 1,0 g K_2HPO_4 , 1,0 g Ammonnitrat, 0,5 g Asparagin, 6 g Traubenzucker, 4 g Glyzerin und wurde mit Natriumcarbonat alkalisch gemacht. Nach dem Sterilisieren wurden folgende Prozente, berechnet auf NaOH, titriert, 0,01, 0,1, 0,2 und 0,3. Kultur 1 stand vom 20. Mai bis 20. Juni, 2 vom

16. August bis 20. Oktober 1911 bei gewöhnlicher Stubentemperatur.

Wachstumsverhältnisse Tabelle 6.

Ganz gegen die Erwartungen zeigten die schwach alkalischen Lösungen recht mäßiges Wachstum, wohingegen der Alkalitätsgehalt von 0,1—0,2 Proz., berechnet für Natronlauge, gute Vegetation aufwies, ein noch höherer Prozentsatz beeinträchtigte die Lebenstätigkeit. Actinomyces chromogenes und S. b. ver-

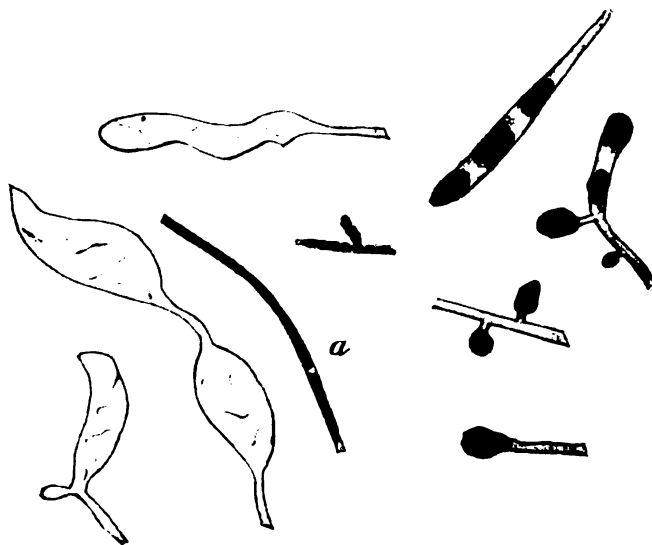


Fig. 2. Actinomyces albus II. a normaler Faden.

Tabelle 6.

Einfluß verschiedener Alkalitätsgrade.

Alkalität berechnet in % Natronlauge	0,01% NaOH	0,10% NaOH	0,20% NaOH	0,30% NaOH
Actinomyces odorifer	1— 2—	4— 4—	4— 3—	2 2—
Actinomyces chromogenes	1— 1—	2— 2—	4— 2—	1— 1—
Actinomyces albus I	1— 3—	4— 4—	4— 4—	2— 0
Actinomyces albus II	1— 2—	4— 4—	3— 4—	1— 2—
Actinomyces S. a.	1— 1—	2— 4—	4— 4—	3— 2—
Actinomyces S. b.	1— 1—	2— 2—	2— 1—	1— 0
Actinomyces S. c.	1— 1—	2— 4—	2— 4—	1— 2—

sagten vollständig und zeigten nur mäßiges Wachstum am Boden der Gefäße, während die anderen Actinomyceten bei gutem Wachstum die Oberfläche der Nährlösung bevorzugten.

Bei der Färbung der Sporen trat nun das umgekehrte Verhältnis als bei den Säureversuchen ein. *Actinomyces odorifer* und *albus* I und II zeigten bei schwach alkalischer Reaktion der Nährlösung weiße Luftsporen, bei stärkerer Alkalität *Act. odorifer* weiße bis weißgraue, *Act. albus* I und II grau bis schwarzgraue Sporen. *Act. S. c.* zeigte weiße und nur bei 0,2 Proz. Alkalität silbergraue Gonidien. *Act. S. a.* bildete stets gelblichweiße bis gelbliche Sporen.



Fig. 3. *Actinomyces chromogenes*. a normaler Faden.

Act. odorifer und *albus* I bildeten stark faltige Kolonien, aber nur bei *Act. albus* I kam es zu ausgesprochener Kraterbildung bei höherer Alkalität. (Siehe Abb. Tafel III, 5.) Mikroskopisch zeigten nur *Act. S. a.* und *Act. S. c.* in allen Lösungen normales Mycel, *Act. S. b.* wuchs in kurzen dicken Stäbchen und Mycelenden, während *Act. odorifer* und *Act. albus* I die verschiedenartigsten Involutionsformen in schwachem Maße zeigten, die dagegen ausgeprägt bei *Act. chromogenes* und *albus* II auftraten.

Die Arbeiten werden nach verschiedenen Richtungen fortgesetzt.

Tafelerklärung.

Tafel I. Oben. Actinomyceten-Wachstum auf Agar.

Von links nach rechts: *Act. odorifer*, *chromogenes*, *albus* I, *S. a.*, *S. b.*, *S. c.*, *albus* II. Unten. Actinomyceten-Wachstum auf Agar-Gelatine. Dieselbe Reihenfolge wie auf Agar.

Tafel II. Actinomyceten auf Agar-Gelatine aufgeimpft. Gelatineverflüssigung noch nicht zu bemerken (0,9 Proz. Agar, 6 Proz. Gelatine). 1. *Act. odorifer*, 2. *Act. albus* I, 3. *Act. S. a.*, 4. *Act. S. c.*, 5. *Act. chromogenes*, 6. *Act. S. b.*

Tafel III. 1. u. 2. Actinomycetensporen in flüssigen Agar geimpft. 1. *Act. S. a.*, 2. *Act. albus* I, Ringbildung.

3. u. 4. *Act. S. b.* (3) und *Act. albus* I (4) in Agar-Gelatinenährboden (0,7 Proz. Agar, 8 Proz. Gelatine) bei Gegenwart von Tyrosin. Verflüssigung der Gelatine bemerkbar (4).

5. *Act. albus* in alkalischer Nährlösung unter Kraterbildung gewachsen.

Antagonism between Anions as affecting Ammonification in Soils.

By Chas. B. Lipman,

University of California, Agricultural Experiment station, Berkeley.

Mit 3 Textfiguren.

Between 1909 and 1910 the writer published a series of three papers¹⁾ in which he furnished evidence, by data obtained in work with soil bacteria, to strengthen further L o e b 's conception of the physiologically balanced solution. That work, however, was carried out with pure cultures of *B. s u b - t i l i s* in culture solutions whose composition was definitely known, and it appeared to be of great interest from the practical as well as theoretical standpoint, to ascertain how salts and, in particular the "alkali salts", as represented by the sodium compounds of hydrochloric, sulphuric and carbonic acids, affect ammonia producing bacteria in their natural medium — the soil — and in the presence of the natural soil flora. It also seemed very desirable to ascertain how far, if at all, we could depend on an antagonism between the anions of these salts and at what concentrations the salts in alkali soils can make each other mutually innocuous to certain groups of soil organisms.

The first part of the problem was investigated and has been reported on by me in another series of three papers²⁾ on the "Effects of Alkali Salts on Soil Bacteria". The second part of the problem has been investigated, likewise, and part of the results obtained are hereinbelow reported.

L o e b 's work in the animal world, O s t e r h o u t 's in the plant world, and that of many others who have worked with or followed them, established firmly not only the conception of the complete "balanced solution", of the first named investigator, but pointed out that antagonism exists between salts even in an incompletely balanced solution. Further, the striking antagonism which they have shown to obtain between various salts was always between the kations of the different salts with the anions being usually the same. The writer has no desire to go into even a brief review of the splendid work above referred to, since that has already been so much more thoroughly done by R o b e r t s o n to whose pamphlet³⁾ the reader is referred, but it must be said here that but very little attempt was made by most of the investigators mentioned to discover what rôle is played by anions as toxic as well as antagonistic agents. Indeed the only papers which I have been able to discover on the latter phase of the subject are those of L o e b⁴⁾, M o o r e⁵⁾ and N e i l s o n⁶⁾. In the first named work the author claims to have obtained only negative results and shows that no definite antagonism is apparent between citric acid ions and CaCl_2 . He further makes the interesting statement however which moves him from his former position that "in the poisonous effect of a sodium chloride solution we must

¹⁾ Botan. Gazette. Vol. 48. p. 105; Vol. 49. p. 41; Vol. 49. p. 207.

²⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 58; Bd. 33. p. 305.

³⁾ Über die Verbindungen der Proteine mit anorganischen Substanzen und ihre Bedeutung für die Lebensvorgänge. (Ergebn. d. Physiol. Bd. 5. p. 216.)

⁴⁾ Americ. Journ. of Physiol. Vol. 6. p. 429.

⁵⁾ Ibid. Vol. 7. p. 315.

⁶⁾ Ibid. Vol. 7. p. 405.

therefore, in all probability, consider the Cl ions as poisonous and not the Na ions as I stated in my former papers". Neilson was unable to obtain an antitoxic effect between Na_2SO_4 and NaCl or LiCl but did obtain it between Na_2SO_4 and NH_4Cl , and the only case on record, so far as I am aware, in which definite antagonism was shown between anions was the work of Moore above cited in which marked antagonism between NaCl and Na_2SO_4 was obtained. In these investigations it was found that tadpoles lived much longer in NaCl to which Na_2SO_4 had been added than in pure NaCl. In fact, Na_2SO_4 was just as efficacious in prolonging life in NaCl solutions as was CaCl_2 . Similar results, though not as marked were also obtained with mosquito larvae.

Why it should have been assumed, prior to Loeb's statement above quoted, that the anion is a negligible factor in studies on salt effects especially as regards antagonism, is not clear. So far as the toxicity of anions is concerned the writer has furnished ample evidence in his second series of papers above cited that very striking differences exist between the anions as to their effects on the different groups of soil organisms, and, while but scant data is at hand even now in support of the antagonism between anions, Miss Moore's results are very striking. The results below given are calculated not only to strengthen the evidence on the existence of antagonism between anions but to shed some new light on the manner in which antagonism may manifest itself under a great variety of conditions. The significance of a possible antagonism between anions to the art of soil management is very great, as I have pointed out in previous papers. To indicate how, I may illustrate by the statement that many of the most fertile lands of the arid regions are impregnated with such large quantities of "alkali"¹⁾, that no crops can be grown on them. Cultural methods can only serve to ameliorate this unfavorable condition partially and temporarily. Washing out the salt by flooding, with the assistance of good drainage is at once a laborious and expensive process, and wasteful, the latter because of the plant foods drained away from the soil. If, however, through the selection of plants resistant to alkali and the further assistance rendered by an antagonizing effect of one salt to another as regards both plants and soil bacteria, we can produce a medium for profitable plant growth, we can have in our power the reclamation for agricultural purposes of large tracts of fertile lands through the employment of means which need be neither very expensive nor very difficult. Now, while the acid radicles commonly classed among the salts of alkali soils may be combined with the alkali earth metals as well as with the alkali metals, the assumption is justified from a study of the composition of alkali soils that a very large proportion of them is combined with sodium to form the various soluble sodium salts. We have further evidence of such a tendency in soils, from the evidence obtained in careful observations, to the effect that sodium residues in soils, from the use of fertilizers like nitrate of soda, tend to accumulate there under certain conditions and to combine with the carbon dioxide always present in large volume in fertile soils to form sodium carbonate known in the parlance of soil experts and farmers as "black alkali".

The selection of plants of a high degree of resistance to the effects of alkali and the neutralization of the toxic effects of one salt by another so

¹⁾ A term used to describe excessive salt accumulations.

far as plants are concerned, is a task which we are engaged on in other phases of our work, but in the present paper the writer desires to discuss the antagonistic effects of salts from the point of view of the soil flora and to consider the antagonism, not from the point of view of the interaction of different basic or kations which, indeed, has been amply proven exists, but from the point of view of the interaction of different acid or kations with a common kation which in this case is represented by sodium.

Methods of the experiments.

The experiments on antagonism between salts which have been published by the author as above cited were carried out in solutions because the direct soil culture method was then first beginning to be used in soil bacteriology, and, secondly, because it was not desirable to have any interfering salts present, which might in any way militate against the success of the experiments with the pure culture of *B. subtilis*. Owing to the practical significance of the work on "alkali effects", however, it was decided that the direct soil culture was eminently better suited to the work inasmuch as it permitted the study of the natural soil flora in its relationships with alkali and further because results obtained from it could be more justly compared and correlated with results obtained from work on the higher plants under similar conditions in their natural medium. In this work, therefore, as in that relating to the toxicity of the alkali salts, above cited, we employed for our culture medium 100 gram portions of the same light sandy loam distributed in tumblers. Two grams of dried blood were added in the usual way and the salts were mixed so that each tumbler received the same amount of one salt used in large enough amounts to be toxic and then received in addition a certain amount of another salt which was to be used to antagonize the first salt. That certain amount was increased by definite intervals in the series, and in accordance with the plans indicated in the subjoined tables. Sufficient water was added to the tumblers to insure an optimum water content and the contents of the tumblers were again thoroughly mixed, covered with petri dish covers and incubated for four days at a temperature varying from 28 degrees to 30 degrees C. Sterile controls as well as cultures untreated with salts were run with all series. The ammonia was determined at the end of the incubation period in the manner described in my papers on the toxicity of the alkali salts which are above referred to.

Series I.

NaCl versus Na_2SO_4 .

The first series of experiments deals with the antagonism between two of the common salts which make up our "white alkali" in soils and is an especially interesting series since the salts are the same between which Moore showed an antagonism to exist in the work above quoted which still forms so far as I am aware the only case on record of definite antagonism between anions. Since NaCl is the more toxic of the two salts for ammonification, I adopted the concentration of .2 per cent NaCl of the dry soil which I had already shown to be a distinctly toxic one and endeavored by adding varying amounts of Na_2SO_4 to neutralize, in some degree, at least, the toxicity of the NaCl. The results obtained from the experiment are given in Table I (see also Fig. 1) and the duplicate determinations as well as the averages are recorded so that one may see the definite effects of the salts.

Table I.
NaCl versus Na₂SO₄.

No.	% NaCl in dry soil	% Na ₂ SO ₄ in dry soil	N. as ammonia produced mgs.		Average N. as ammonia produced mgs.
			1	2	
1	0	0	55.16	53.76	54.46
2	.20	0	30.52	30.94	30.73
3	.20	.10	31.78	31.78	31.78
4	.20	.20	30.80	33.46	32.13
5	.20	.30	37.66	36.54	37.10
6	.20	.40	28.84	30.24	29.50
7	.20	.50	28.28	26.60	27.44
8	.20	.60	28.28	25.90	27.09
9	.20	.70	26.88	25.48	26.18
10	.20	.80	22.82	24.64	23.73

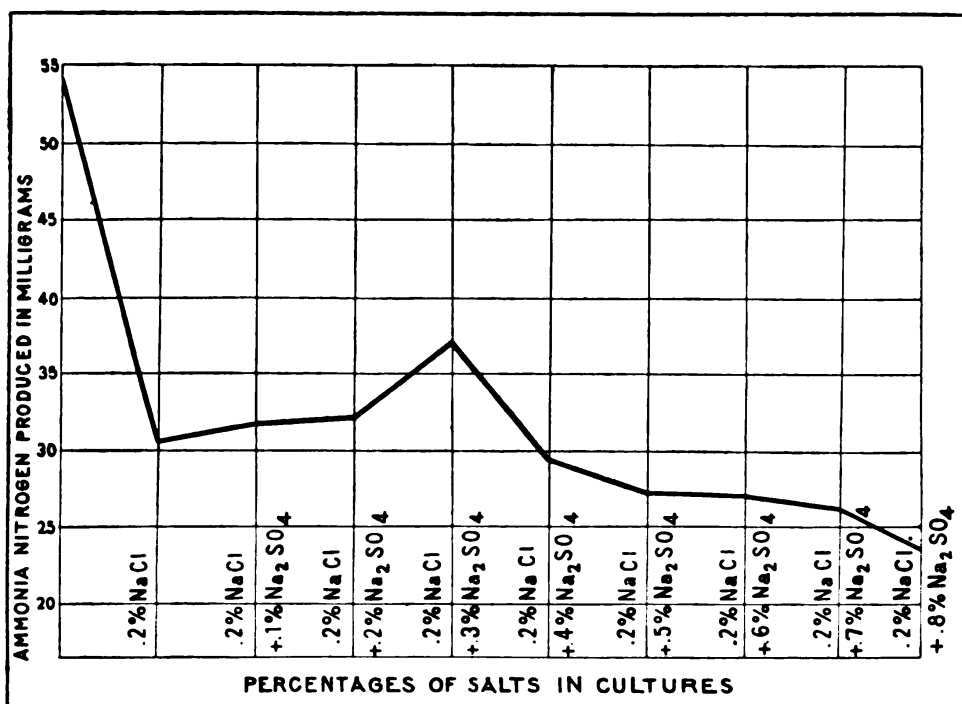


Fig. 1.

It is nothing short of striking to note the plainly evident effects of the interaction of salts on the ammonifying flora of soils as exhibited in the foregoing table. In culture No. 2 we have again the distinct evidence of the toxic nature of NaCl to ammonification, and then we can note the gradual betterment of the soil medium, not through the removal of NaCl but through the addition of larger and larger quantities of another salt which is itself toxic to the ammonifying flora. The most marked and rather sudden antagonism occurs, however, when .3 per cent of Na₂SO₄ is added to .2 per cent NaCl. It is a curious fact therefore that in the presence of .5 per cent of "white alkali" much more vigorous ammonification occurs than in the presence of .2 per cent of NaCl alone, and even in the presence of .6 per cent of total "white alkali" or .2 per cent NaCl plus .4 per cent Na₂SO₄ very

nearly as much ammonia is produced as in the presence of merely .2 per cent NaCl alone. After that point, however, larger additions of Na_2SO_4 to the NaCl make the combination gradually, but steadily, more and more toxic. The duplicate determinations are purposely given to show that in all essential respects the marked changes occur at the same concentrations in duplicate cultures. In this connection it must be added that considering the large variety of organisms in a soil flora which take part in the ammonification of the nitrogen of dried blood and the inevitable differences which must obtain in even two duplicate samples of dried blood and two duplicate samples of soil, it is remarkable that such good agreement as is shown above has been obtained in the experiments. To prove, further, that the fair agreement between duplicates is not accidental we have repeated each of the series twice or three times and results of the same general nature and varying only absolutely but not relatively were obtained every time. It is true, however, that these investigations have given ample evidence that good agreement between duplicate samples and good results in general can only be obtained at the price of the most painstaking precautions in all the manipulations concerned in the work.

The data in Table I would seem therefore to substantiate the evidence furnished by Moore on the antagonism between NaCl and Na_2SO_4 and to prove again the idea which Osterhout has attempted to make clear that not the total quantity of salts but the relative quantities of its components in a medium are of the first importance in the determination of its fitness for a certain organism. In other words there is a sharp difference between the nutrient and the balanced solution. But the data above given emphasizes what Loeb and Osterhout have not shown, and, namely, the definite antagonism between anions, which is of especial significance because it follows but one piece of evidence which proves the existence of such antagonism. Sodium chloride and sodium sulfate were further chosen as the first series in this work so as to make impossible the objection which may be urged to the use of Na_2CO_3 owing to the hydroxyl ions which are set free in its use. Both NaCl and Na_2SO_4 are toxic alone to ammonification in soils at the concentrations at which, when present together, they show marked antagonism and a lowering of the toxicity. Other considerations with reference to the nature and extent of antagonism and their relation to practical factors in soil management will be discussed below.

Series II.

NaCl versus Na_2CO_3 .

Having established above the existence of antagonism, between NaCl and Na_2SO_4 , it appeared of interest to ascertain what effect Na_2CO_3 would exert on NaCl under similar conditions since it can no longer be claimed that those effects would be due wholly to the hydroxyl ions set free in the dissociation of Na_2CO_3 . Referring again to my work on the toxicity of the alkali salts on ammonification we find that Na_2CO_3 does not become toxic for the ammonifying flora of a soil until a concentration of more than 1.2 per cent is reached and that it actually stimulates the ammonifying organisms considerably until the concentration reaches .6 per cent and appreciably even up to a concentration of 1 per cent Na_2CO_3 . It is well in following the succeeding table to bear that fact in mind. We have here therefore "black alkali" versus the most toxic component of the more common form

of "white alkali". Both of these salts are very toxic to the higher plants, but only one of them is toxic to ammonification. The experiment was arranged in the same manner as the preceding. NaCl was used throughout in the same concentrations, but Na_2CO_3 was substituted for Na_2SO_4 and the concentrations of it employed are given in the Table. The results follow in Table II (see also Fig. 2).

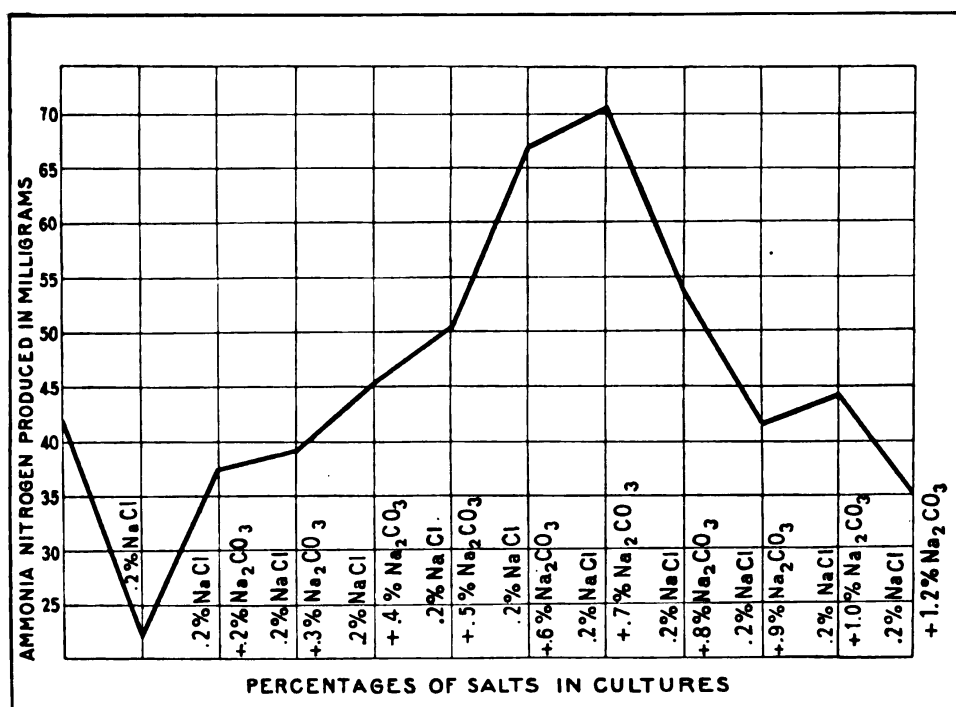


Fig. 2.

Table II.
NaCl versus Na_2CO_3 .

No.	% NaCl in dry soil	% Na_2CO_3 in dry soil	N. as ammonia produced mgs.		Average N. as ammonia produced mgs.
			1	2	
1	0	0	40.25	43.26	41.75
2	.20	0	22.61	21.49	22.05
3	.20	.20	38.29	37.31	37.80
4	.20	.30	39.69	38.99	39.34
5	.20	.40	44.17	46.69	45.43
6	.20	.50	49.91	50.61	50.26
7	.20	.60	68.95	66.15	67.55
8	.20	.70	69.37	72.03	70.70
9	.20	.80	53.13	54.25	53.69
10	.20	.90	41.09	42.63	41.86
11	.20	1.00	45.29	43.19	44.24
12	.20	1.20	34.23	35.77	35.00

Whatever interpretation may here be placed on the word "antagonism", a subject which I shall discuss below, it seems emphatic enough from the foregoing table that up to a concentration of about .7 per cent Na_2CO_3 the

25*

more of that salt there is added to the soil culture containing. 2 per cent NaCl, the more markedly the evidence of the toxicity of the latter salt is obliterated. While it is true that in the absence of NaCl the cultures would have produced more ammonia than they did in its presence and that of varying amounts of Na_2CO_3 , it is likewise true that NaCl is powerless to exert its full toxic action in the presence of Na_2CO_3 . For example the addition of .2 per cent NaCl to a soil containing no Na_2CO_3 lowers its normal ammonia producing power from 41.75 mgs. N. as ammonia to 22.05 mgs. N. as ammonia, but as soon as .2 per cent Na_2CO_3 is added we have a rise in the production of ammonia to 37.80 mgs. N. as ammonia and it is to be especially noted for comparison later that the ammonia production steadily and markedly increases until in No. 8, where we have a total salt content of .9 per cent, there is a most vigorous production of ammonia equivalent to considerably more than three times the amount produced in the presence of a total salt content of only .2 per cent but which consists only of NaCl. To put it more emphatically while .2 per cent NaCl has the power in the absence of appreciable quantities of other salts of lowering the ammonifying power of a normal soil by about 50 per cent it loses a very large part of that power when Na_2CO_3 is added in varying quantities and its toxicity is most largely neutralized through the addition of .7 per cent Na_2CO_3 .

The writer has already called attention in a previous paper¹⁾ to the striking stimulation exercised by Na_2CO_3 on ammonification in soils and its apparently innocuous nature to the ammonifying flora, but he has likewise noted something which will be of interest here in passing and namely that in peptone solutions with pure cultures of *B. subtilis* (an ammonifying organism of good physiological efficiency), considerably less than .1 M. concentrations of Na_2CO_3 are sufficient to inhibit ammonification and cause *B. subtilis* to assume the spore form. This striking circumstance is of prime importance since it emphatically illustrates the large discrepancies which are likely to occur in culture solutions and in soils, and indicates that it is not safe to apply data obtained in one kind of culture to another. My experience has been the same with the higher plants as with the bacteria. I give below another table which shows how Na_2CO_3 affects the ammonifying power of the same soil used above but containing no NaCl. This is not only of interest for purposes of comparison with the preceding table but because that comparison brings out a very interesting point with reference to antagonism which deserves discussion.

From a comparison of Tables II and III it appears that the antagonism in the first reaches its highest point at the same concentration of Na_2CO_3 as that which gives the greatest amount of stimulation to the ammonifying flora and were it not for the discussion above given and remarks to follow a casual glance at these tables would incline one to the idea that no antagonism exists between NaCl and Na_2CO_3 but the first salt merely depresses the stimulation of the second. That argument has been partly answered above, but another striking point also enters in here. The amounts of ammonia produced in the last series as shown in Table III increase only gradually, as the concentration of Na_2CO_3 increases, up to the point where stimulation is greatest, and the irregularity which is found there, besides, as for example in Nos. 1, 2, 3 and 4 (both of which are characteristic of soil cultures con-

¹⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 58.

taining a large quantity of Na_2CO_3 and producing very large quantities of ammonia) would seem to indicate that while there is some added stimulation as the concentration of Na_2CO_3 increases from .2 per cent to .7 per cent it is not very large and ammonia production is almost uniformly large in all the cultures until the point of toxicity is reached. Even then, it might be added, toxicity manifests itself only gradually. But what do we find in Table II with respect to the same series of concentrations of Na_2CO_3 but which have had NaCl added to them? Instead of obtaining a uniform de-

Table III.
Effects of Na_2CO_3 on Ammonification in Soils.

No.	Concentration of Na_2CO_3 % in dry soil	N. as ammonia produced mgs.
1	.20	78.33
2	.30	72.10
3	.40	74.06
4	.50	76.23
5	.60	79.66
6	.70	81.20
7	.80	72.03
8	.90	59.99
9	1.00	54.88
10	1.20	55.44

pression in ammonia production, which we should in the absence of antagonism and the presence of the same quantity of NaCl in all the cultures, we obtain large decreases in ammonia production with the addition of small amounts of Na_2CO_3 to the same amount of NaCl and smaller and smaller decreases in the amount of ammonia produced as the amounts of Na_2CO_3 are gradually increased. There appears to be evidence therefore from a comparison of the last two tables that there is a reaction, which is evidently an antagonism, whose power to neutralize the toxic effects of NaCl to the ammonifying flora in the soil employed is enhanced by increasing the amounts of Na_2CO_3 up to the point noted, and yet these increasing amounts of Na_2CO_3 in the absence of the NaCl stimulate the organisms about uniformly and allow them to produce about the same large quantities of ammonia. It certainly appears from a careful consideration of these facts that the toxicity of the NaCl is the dominant factor where the concentration of Na_2CO_3 is low but that the latter salt is the dominant factor in higher concentrations despite the presence of the same amount of NaCl . This appears to me to be a clear case of antagonism.

Series III.

Na_2SO_4 versus Na_2CO_3 .

The next series was arranged to complete the simple combinations between the three "alkali" salts and to note the effect of using a quantity of Na_2SO_4 which was very toxic against varying amounts of Na_2CO_3 . My work on the toxicity of Na_2SO_4 for ammonifying organisms indicated a distinct toxicity at .2 per cent concentration in the soil, but not as marked as that of NaCl at the same concentration. It also showed a tendency of

becoming only gradually more toxic as the concentrations increased as contrasted with the sudden, extreme toxic effects of NaCl. It appeared of interest, therefore, to test out a concentration of Na_2SO_4 which was about as toxic as .2 per cent NaCl for the ammonifying flora of the soil employed and .9 per cent Na_2SO_4 was chosen. It seemed, further, that such a series of determinations would also allow of a comparison between the antagonistic powers of the less toxic sulphate anion with that of the more toxic chloride anion used in the last series. With the experiment arranged in other respects like the preceding the results obtained were as follows (see also Fig. 3).

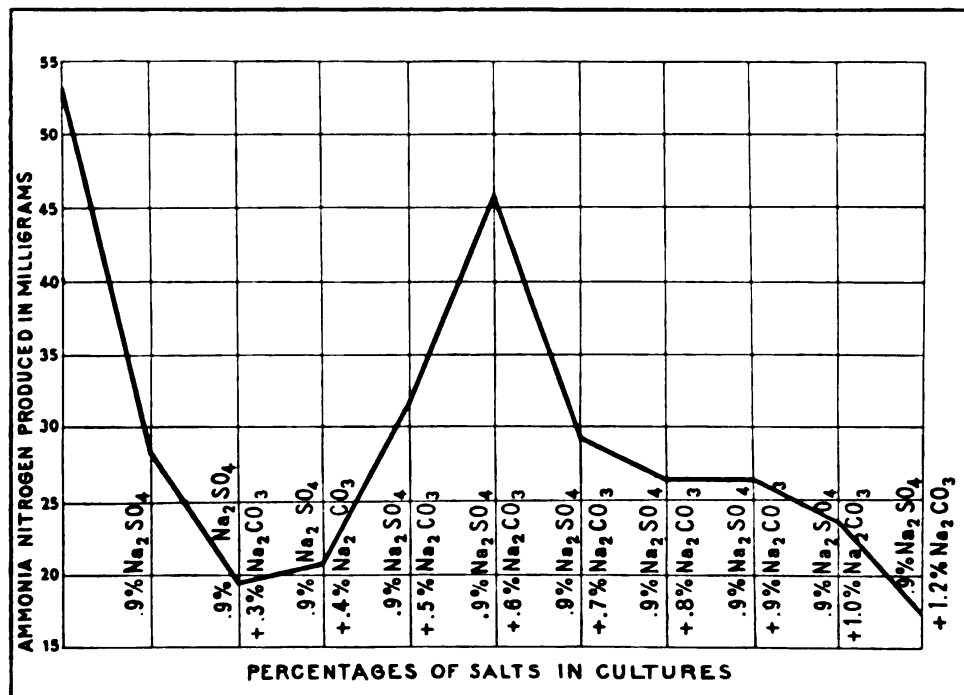


Fig. 3.

Table IV.

 Na_2SO_4 versus Na_2CO_3 .

No.	% Na_2SO_4 in dry soil	% Na_2CO_3 in dry soil	N. as ammonia produced mgs		Average N. as ammonia produced mgs
			1	2	
1	0	0	55.89	51.27	53.58
2	.90	0	27.82	29.36	28.59
3	.90	.30	19.19	19.90	19.55
4	.90	.40	20.80	20.66	20.73
5	.90	.50	31.67	31.25	31.46
6	.90	.60	46.31	44.45	45.38
7	.90	.70	32.16	26.00	29.08
8	.90	.80	27.82	24.74	26.28
9	.90	.90	27.12	25.22	26.17
10	.90	1.00	25.58	21.03	23.31
11	.90	1.20	18.65	16.41	17.53

Scarcely anything more striking, by way of illustrating the genuineness of antagonism between salts, could be adduced from experimental data

than the foregoing table. When contrasted with Table II, Table IV shows, not only, a case of antagonism as it does distinctly where the higher concentrations of Na_2CO_3 are used with the constant amounts of Na_2SO_4 , but there is a manifestation of more marked toxicity in No. 3 where only .3 per cent Na_2CO_3 is added to .9 per cent Na_2SO_4 than where only the Na_2SO_4 is present as in No. 2. Whereas, therefore, even .2 per cent Na_2CO_3 is sufficient to antagonize .2 per cent NaCl sufficiently to yield a very considerable increase of ammonia over the culture containing the NaCl alone as shown in Table II, even .3 per cent Na_2CO_3 is, not only, not sufficient to antagonize .9 per cent Na_2SO_4 but seems to enhance the toxicity of the latter. After that, however, increasingly large concentrations of Na_2CO_3 show a more and more marked tendency to neutralize the toxic properties of .9 per cent Na_2SO_4 until in No. 6 we find that a culture containing 1.5 per cent of total salt .9 per cent which is Na_2SO_4 produces about 60 per cent more ammonia than culture No. 2 which contains the same quantity of Na_2SO_4 but receives no addition of Na_2CO_3 .

It is also very noteworthy that the total increase of ammonia in culture No. 6 over culture No. 5 is much more marked than between any other two succeeding cultures of the series. In respect to the maximum amount of ammonia produced in the cultures of this series, again, we have a striking similarity to the data obtained in Series II. In the former case the largest quantity of ammonia was produced in the culture containing .6 per cent Na_2CO_3 while in the latter the maximum was reached in the culture containing .7 per cent Na_2CO_3 .

After the concentration of .6 per cent Na_2CO_3 is reached and passed in the foregoing series, we note a gradual decrease in ammonia production especially beginning with No. 7 and going down through the higher concentrations of Na_2CO_3 . This is in striking contrast again to the sudden rise in ammonia production from concentration to concentration as the Na_2CO_3 increases prior to reaching the maximum point in No. 6. Quite apart, therefore, from the subject of the nature of antagonism we have ample evidence from the foregoing data that Na_2CO_3 has the power of so far neutralizing the toxic effects of .9 per cent Na_2SO_4 in the soil as to allow the production of much more ammonia when the total salt content is increased to 1.5 per cent by the addition of .6 per cent Na_2CO_3 than in any of the other cultures with lower total salt contents, and markedly more than in the culture with .9 per cent Na_2SO_4 only, or in that containing in addition .3 per cent Na_2CO_3 . While I have shown (see Table III) further that the maximum point of stimulation to ammonification is reached at a concentration of about .7 per cent Na_2CO_3 , I have also emphasized the fact that there is but a gradual increase of ammonia in the various cultures until that concentration is reached. For that reason we should expect that if there were no antagonizing effect in the phenomenon noted in Table IV that the same amounts of ammonia or approximately the same would be produced in all cultures until the maximum point of stimulation has been reached. This is, however, emphatically not the case, and instead it would appear from the facts that in the presence of a constant amount of Na_2SO_4 at a concentration of .9 per cent the addition of Na_2CO_3 is only useful in overcoming the toxic effects of the first salt when its own concentration is large enough to give the ammonifying organisms the greatest amount of stimulation and that greatest amount of stimulation is only manifest, really, when another toxic salt is matched

against it, for there would seem to be a most marked difference between the stimulating powers of varying quantities of Na_2CO_3 in the presence and in the absence of other salts.

Theoretical considerations.

Connected with the results above reported is the question as to what constitutes genuine antagonism. Is it necessary that a combination of two salts, for example, should render a medium less toxic for a certain organism than it would be rendered by the presence of either salt alone? Or, is the betterment accomplished in a medium through the addition of a non-toxic salt to a toxic one sufficient proof of an antagonism between the salts tested, even if the medium would be even more favorable if the non-toxic salt alone were present? In other words while it is quite clear that when two salts, like NaCl and Na_2SO_4 , mixed in toxic concentrations in soils yield a better medium for ammonification than either could yield alone, we have an undeniable antagonism between the anions, it has not always been accepted by some that a mixture of a toxic and a non-toxic or stimulating salt when rendering the medium more suitable for a certain organism or group of organisms than if the toxic salt alone were present is accomplishing that by virtue of an antagonism but that it may merely represent a lowering of the stimulating power of the non-toxic salt. That would, however, appear to the writer to be a one sided view of the matter and only takes into consideration the favorable action of the non-toxic salt and the depression thereof through the addition of the toxic one. It seems to me, in all justice to the subject, that the question should be looked at from the point of view of the toxic salt as well, and when we do so what do we find? To take the data in Table II as a concrete illustration it seems clear enough first that .2 per cent NaCl is distinctly toxic to ammonification and secondly that despite that fact additions of varying quantities of Na_2CO_3 to the medium already containing NaCl produce a much better condition for ammonification than if NaCl were allowed to act by itself. In other words, therefore, while it is quite true that those amounts of Na_2CO_3 employed would in the absence of NaCl have allowed the production of larger amounts of ammonia in the soil used than when they are mixed with NaCl , it is likewise distinctly evident that the latter salt is unable, in the presence of sodium carbonate, to exercise its full toxic power. The important point in the data referred to, it would appear to the writer, is the fact that a medium owing its toxicity to a certain concentration of NaCl is ameliorated for the ammonifying flora by additions of Na_2CO_3 , and this should be considered a case of genuine antagonism. It would seem an entirely just connotation to invest the word antagonism with the significance of a power which makes, through interaction of ions, for a more favorable medium than can be given it by either or any one of the salts or ions concerned.

It appears to me also to be of very striking theoretical interest, in following further the data of Table II to note that up to a certain point larger and larger amounts of Na_2CO_3 give more and more marked increases in ammonia production, and yet there is comparatively little difference between the amounts of ammonia produced by these varying quantities of Na_2CO_3 if NaCl is absent. This fact not only strengthens the evidence as to the existence of a genuine antagonistic effect between NaCl and Na_2CO_3 , but indicates the much more powerful antagonistic effect of larger than of smaller

quantities of Na_2CO_3 . The latter when present alone, as has been shown above, only shows slight differences in the degree to which it stimulates ammonification as its concentration is increased, but when present with NaCl very large differences occur in the amounts of ammonia produced as the amount of Na_2CO_3 increases. This fact would seem either to denote the really greater stimulating power of larger quantities of Na_2CO_3 or the greater antagonistic effect thereof and while both may be true the presumption is in favor of the latter interpretation when the data in both tables II and III are carefully studied.

It is deserving of note here again, regardless of what the status of antagonism may be, when two salts, one toxic and the other non-toxic or stimulating, are matched against each other, that I have shown antagonism to exist, very definitely between two salts both of which were employed at toxic concentrations. In table I it is strikingly manifest that a combination of .2 per cent NaCl and .3 per cent Na_2SO_4 allow a much larger production of ammonia than .2 per cent NaCl alone and yet the latter is antagonized by a salt which is itself distinctly toxic to the ammonifying flora in the soil employed. This tends to strengthen further, it would appear to the writer, the idea of the genuine antagonism existing between anions.

We find in Table IV data which possess a pronounced theoretical interest, but whose cause is not easy to discover. The addition of .3 per cent and .4 per cent Na_2CO_3 respectively to cultures Nos. 3 and 4, each containing .9 per cent Na_2SO_4 , induces a decrease in ammonia production much beyond the decrease induced by .9 per cent Na_2SO_4 alone, and yet in cultures Nos. 5 and 6 there is a rapid rise in the amount of ammonia produced despite the fact that the additions of Na_2CO_3 are greater in the last named cultures than in the first named. We have here the only case of all the series of experiments reported in this paper, in which the combinations of salts tested have shown in some concentrations increased toxicity and in other combinations very much decreased toxicity. As is shown graphically in the curve drawn on the basis of the data in Table IV (see Fig. III), the addition of .2 per cent Na_2CO_3 to culture No. 3 yields a sharp drop in the curve, a further addition of .1 per cent Na_2CO_3 gives only a slight rise in the curve, and a still further addition of .1 per cent Na_2CO_3 gives a very sharp and marked rise in the curve. Beyond that point a further addition of .1 per cent Na_2CO_3 yields the sharpest and greatest rise in the curve with the maximum point of that series reached, in ammonia production.

There can be no doubt from an examination of these data of the power of anions to antagonize each other and indeed the power seems to be just as marked as it has been shown to be for cations by the careful researches of Loebl, Osterhout and their coworkers. While, however, antagonism for cultures certainly exists between anions of salts, it is not so easy to explain the real nature of the antagonistic action unless we conclude in general as Osterhout has done that the ions mutually inhibit each other's entrance into the cell and thus neutralize each other's toxicity.

The curious manifestation of the interaction of Na_2CO_3 and Na_2SO_4 above given, while difficult of interpretation, indicates to my mind again the dominant nature of the toxic salt whose marked toxicity can only be overcome by considerable quantities of a stimulating salt when the effects of the latter become dominant. Before, however, that point is reached, the stimulating salt seems not only not to exercise any stimulating effect, but enhances the

toxic effects of the other salt. It is possible that certain concentrations of the other salts tested may be found in which a similar phenomenon is manifested. The possibility also exists that of the large variety of organisms which constitute the ammonifying flora of a soil some may be more favorably affected by one combination of salts than by another or even by each of the single salts, and that as between the relationships of .9 per cent Na_2SO_4 and .3 per cent Na_2CO_3 and .9 per cent Na_2SO_4 and .6 per cent Na_2CO_3 we are dealing with a combination of the two salts most favorable to the weakest portion of the ammonifying flora and one most favorable to the strongest portion of that flora respectively. These are only offered as interesting speculations in the hope that they may stimulate further research which may result in the solution of some of these intricate problems connected with the physiology of soil organisms.

It should be added here also as another point of theoretical interest that the foregoing results would seem to support the idea of the antagonism of one ion by another but not necessarily to indicate that the antagonism is mutual. Moreover, it seems that the antagonistic effect is carried out by the less toxic ion or by the stimulating ion in a mixture of two salts with a common kation.

As to the practical significance of these results, more can be said when the balance of the work upon which the writer is now engaged can be completed. In a simultaneous series of experiments on the effects of the salts here studied on the higher plants, and the nitrifying, and nitrogen fixing bacteria of the soil which is now in operation, it is hoped that we may obtain data of very decided practical significance.

Conclusions.

1. Antagonism between anions as measured by its effects on ammonification in soils has been found to exist between NaCl and Na_2SO_4 , between NaCl and Na_2CO_3 and between Na_2SO_4 and Na_2CO_3 or between the anions of the salts mentioned.

2. Antagonism is shown most strongly between Na_2CO_3 and NaCl , is next strongest between Na_2CO_3 and Na_2SO_4 , and weakest between NaCl and Na_2SO_4 .

3. The greatest antagonism was noted between .2 per cent NaCl and .7 per cent Na_2CO_3 of the dry weight of the soil, and the antagonism increased in that series from the point at which .2 per cent Na_2CO_3 was added to .2 per cent NaCl with a yield of 37.80 mgs. N. as ammonia to the maximum yield of 70.70 mgs. of N. as ammonia.

4. The evidence obtained by Miss Moore in favor of the existence of antagonism between Na_2SO_4 and NaCl which forms the only case on record so far as the writer is aware, is now confirmed.

5. The term "antagonism" when applied to salts or ions should connote the lowering of the toxicity of the whole medium when one salt is added to one or more others even though the stimulating power of the salt thus added is reduced.

6. Antagonism is here shown between toxic and stimulating salts as well as between two toxic salts.

Nachdruck verboten.

Zur Kenntnis des Sempervivum-Rostes.

Von Dr. E. Werth,

Mit 1 Tafel und 3 Textfiguren.

Die *Endophyllum*-Arten sind von allen Rostpilzen besonders bemerkenswert und interessant dadurch, daß sie nur eine einzige Chlamydosporenform produzieren, welche die Charaktere der Aecidien- und Teleutosporenform anderer Uredineen in sich vereinigt. Diese Sporenform hat man daher mit vollem Recht bald als Aecidio-, bald als Teleutospore bezeichnet. Auch die Untersuchung der Kernverhältnisse im Entwicklungsgange des Pilzes hat keinerlei Resultate ergeben, welche die Sporen bestimmt der einen oder anderen Gruppe zuzuweisen gestatten. Im Gegenteil hat sie, wie die schöne und ausführliche Arbeit von A. W. H. Hoffmann¹⁾ über diesen Punkt klar zeigt, voll und ganz das bestätigt, was man ohne zytologische Untersuchung lange erkannt hatte: Die Chlamydosporen von *Endophyllum* gleichen in ihrer Entstehung den Aecidiosporen, in der Art ihrer Keimung aber den Teleutosporen anderer Rostpilze.

Betreffs der Keimung der Sporen muß jedoch daran erinnert werden, daß schon vor vielen Jahren von Nypels²⁾ beobachtet worden ist, daß in manchen Fällen die Chlamydosporen von *Endophyllum Sempervivi* wie typische Aecidiosporen keimen und einen langen, einfachen und nicht septierten Faden bilden. Auch Maire³⁾ konnte diese Keimungsart bestätigen. Sie ist besonders interessant und erneuter Nachprüfung wert bei der Doppelnatur der Sporen von *Endophyllum*. Da ich selbst ganz zufällig und unabhängig dieselbe Beobachtung gemacht und im Laufe mehrerer Jahre immer wieder nachgeprüft habe, so möchte ich im folgenden kurz darüber berichten, zumal Hoffmann in seiner eben zitierten, erst im letzten Jahre erschienenen Arbeit angibt, daß er an seinem Materiale die Beobachtungen Nypels' und Maires nicht habe bestätigen können.

Auch in einer anderen Beziehung ergeben die Angaben von Hoffmann eine Differenz gegenüber älteren Beobachtungen. Das ist in bezug auf die Art der Einwirkung des Pilzes auf die Wirtspflanze. Da ich bei der Beschäftigung mit dem *Sempervivum* roste auch diese Frage in den Kreis meiner Betrachtung gezogen habe, so werde ich mich im folgenden auch darüber kurz auslassen und sodann noch eine nähere Beurteilung der Blattdeformation der Wirtspflanze daran anschließen.

I. Die Sporenkeimung von *Endophyllum Sempervivi*.

Die die Sporenlager tragenden, deformierten Blätter der Nährpflanze erschienen bei meinen Exemplaren in der ersten Hälfte des April; gegen Mitte dieses Monats waren die ersten Pykniden geöffnet, während die Aecidien erst im letzten Drittel des April aufzubrechen begannen. Die Produktion von Pykniden und Aecidien dauerte an bis Mitte Juni; im letzten

¹⁾ Hoffmann, A. W. H., Zur Entwicklungsgeschichte von *Endophyllum Sempervivi*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 136—158.)

²⁾ Nypels, P., La germination de quelques Ecidiospores. (Ann. Soc. Belge de Microsc. T. 22. 1898. p. 101—111.)

³⁾ Maire, R., L'évolution nucléaire chez les *Endophyllum* (Journ. de Bot. T. 14. 1900. p. 80 ff.)

Drittel dieses Monats war die Krankheitserscheinung im Erlöschen, und die letzten Aecidien-Pusteln lieferten noch eben keimfähige Sporen. Die Infektion neuer Sempervivumpflanzen geschah in der Weise, daß abgeschnittene pusteltragende Blätter über der gesunden Blattrosette angebracht wurden. Die zu infizierende Pflanze wurde unter Umständen noch eine mehr oder weniger lange Zeit durch Überstülpen einer Glasglocke feucht gehalten.

Die ersten Pykniden treten im untersten Viertel bis zur Mitte des kranken Blattes, ober- wie unterseits auf, die Aecidien in der oberen Blatthälfte und etwas tiefer, ebenfalls ober- wie unterseits. Doch kommen später Pykniden auch höher, in den Aecidiengruppen, gelegentlich bis zur Spitze des Blattes vor.

Die Keimung der Pyknidensporen konnte auf keine Weise bewirkt werden. Die Chlamydosporen keimen in feuchter Luft, auf der Oberfläche und am Rande eines Wassertropfens, in der bekannten Weise, indem sie senkrecht in die Luft hinein ein Promycel mit Sporidien (Basidie mit Basidiosporen) bilden. Diese Keimung geschieht unter der feuchten Glocke bereits massenhaft in den Aecidien; doch treten hierbei sehr viele atypische Promycelformen auf, mit sehr verlängerten Sterigmen und ähnlichem, vielleicht bedingt durch den Raummangel zwischen den dicht beieinander lagernden Sporen. Im typischen Falle gliedert das Promycel vier Sporidien ab (Fig. 3), doch kommen sehr häufig auch dreiteilige (Fig. 2 u. 28) und gelegentlich solche mit 2 oder 5 Sterigmen vor (Fig. 1 u. 4). Unter besonderen Umständen, wenn viele Sporen haufenweise zusammenliegen, bei mäßiger Wasserbedeckung, sieht man zahlreiche unregelmäßige Figuren, wie namentlich astartig verlängerte Sterigmen und sehr lange, aufrecht gegen die Wasseroberfläche wachsende Keimschläuche (Fig. 18).

Die Sporidien sind sofort keimfähig (Fig. 16, 20, 22) und treiben gelegentlich schon vor dem Abfallen vom Promycel einen Keimschlauch aus (Fig. 27).

Der Sporidienkeimfaden durchbohrt, wie bekannt, die Epidermiswand des Wirtspflanzenblattes und schwillt unterhalb derselben bläschenförmig an (Fig. 21). Der Inhalt tritt in die Blase über, und es wird dann ein verzweigtes Mycel gebildet, das in die Interzellularen gelangt und, wie schon de Bary¹⁾ beobachtet hat, sich rasch in der Wirtspflanze verbreitet.

Ganz anders gestaltet sich nun die Keimung der Chlamydosporen unter stärkerer Wasserbedeckung. Während die auf demselben Wassertropfen schwimmenden und am Rande derselben liegenden Sporen Promycelien und Sporidien erzeugt haben, bilden die durchgesunkenen und am Boden auf dem Deckglas liegenden einfache Schläuche (Fig. 6—8). Diese sind oft korkzieherartig gewunden (Fig. 9, 12, 15, 17) und fast durchweg und lange ohne erkennbare Scheidewände. Die Schläuche liegen im allgemeinen parallel dem Boden — wie z. B. Fig. 14 u. a. deutlich zeigt, wo der Keimfaden zwischen zwei, noch ungekeimten, am Boden liegenden Sporen sich hindurchwindet — und zeigen kein Verlangen gegen die Wasseroberfläche und in die Luft zu wachsen. Neben den korkzieherartigen kommen auch ungewundene oder doch ziemlich gerade, einfache Schläuche vor (Fig. 13), ohne Scheidewände. Scheidewandbildung tritt zwar öfter, namentlich im unteren Teil des Keimschlauches auf, doch sieht man auch bereits sehr lange Schläuche

¹⁾ de Bary, A., Untersuchungen über die Entwicklung einiger Schmarotzerpilze (Flora. 1863. p. 177 ff.)

(Fig. 8, 12 u. a.) ohne solche, während beim *Promycel* doch offenbar sehr frühzeitig die Querwände angelegt werden (Fig. 5). Auch kurze, junge Schläuche der unter Wasser keimenden Sporen zeigen schon meist ein ganz anderes Bild (Fig. 6 u. 7) wie die jungen Basidienanlagen. Gelegentlich kommt auch eine Gabelung des Keimschlauches unmittelbar an seiner Basis vor (Fig. 10). Korkzieherartige Windungen treten, in geringerem Maße, auch wohl an der Basis der *Promycelien* auf (Fig. 26). Blasenartige Anschwellungen unmittelbar am Austrittspunkte des Keimfadens aus der Spore sieht man bei der Unterwasserkeimung sehr häufig (Fig. 12 u. 13), sie kommen jedoch ebenso bei der *Promycelkeimung* vor (Fig. 28).

Die auffallende, fast ausnahmslose Keimung der Sporen in der geschilderten Weise unter Wasser, läßt es ausgeschlossen erscheinen, daß etwa nur bestimmte Sporen jedes *Aecidiums* für die Wasserkeimung, die anderen für die Basidienbildung in Luft prädisponiert seien. Ebenso können nicht die Sporen der verschiedenen Becher in dieser Beziehung verschieden gearartet sein, da die mit *Promycel* wie mit Schlauch keimenden aus ein- und demselben *Aecidium* stammen.

Unter dem Deckglas blieb die Keimung regelmäßig überhaupt aus und geschah auch im Verlaufe von vielen Tagen nicht. Es scheint nicht unwahrscheinlich, daß Luftmangel in der Flüssigkeit Ursache dieses Verhaltens ist, zumal auch bei der Wasserkeimung im offenen Tropfen eine Verzögerung des Beginnes um etwa 20 Stunden gegenüber der Luftkeimung (in Basidien) statthatte.

Nypels (a. a. O.) beobachtete die Keimung der Chlamydosporen von *Endophyllum Semperviri* nach Art typischer *Aecidiosporen* nur relativ selten und zwar, wie er ausdrücklich bemerkt, auch an der Oberfläche, nicht in der Tiefe der Flüssigkeit. Er betrachtet diese Keimungsart daher nur als eine Abnormität, vielleicht atavistischen Ursprungs. Auch ich möchte, trotzdem unter gegebenen Bedingungen die Keimung nach *Aecidiosporen*-art so gut wie ausnahmslos bei meinen, durch mehrere Jahre fortgesetzten Versuchen eintrat, nur eine mehr oder weniger pathologische Erscheinung hierin erblicken. Auch scheint es mir fraglich, ob das geschilderte Verhalten der Sporen von *Endophyllum Sempervivi* eine Bedeutung für die Beurteilung der von *Maire*¹⁾ aufgestellten Varietät *E. Sempervivi* var. *aecidioides* hat. Immerhin scheint mir aber die doppelte Keimungsmöglichkeit der einzigen Chlamydosporenform unseres Pilzes ein nicht unbedeutendes Interesse zu erheischen im Hinblick auf die Entstehung der verschiedenen Chlamydosporenformen und deren wechselnde Funktionen, sowie den damit einhergehenden Wirtswechsel so vieler Rostpilze.

Es schien mir daher auch der Mühe wert und nicht ganz aussichtslos, einen Infektionsversuch unter Wasserbedeckung vorzunehmen. Es wurde zu dem Ende ein Teilstück eines *Sempervivum*blattes in einen auf einem Deckglase befindlichen und mit frischen Sporen beschickten dicken Wassertropfen gelegt, und durch stete Nachfuhr von Flüssigkeit dafür Sorge getragen, daß die Sporen nur unter Wasser mit der Epidermis des Wirtsblattes in Verbindung treten konnten.

Es trat nach Verlauf von zwei bis vier Tagen massenhafte Keimung der Sporen mit einfachen Keimschläuchen — ohne *Promycel*- und *Spodien*-bildung — ein, und es konnte wiederholt beobachtet werden, wie die

¹⁾ a. a. O.

Keimschläuche den Versuch machten, unmittelbar in die Epidermis des Wirtes einzudringen. Es ergab sich dabei mit mehr oder weniger geringen Variationen das durch Fig. 19 wiedergegebene Bild: Das Keimschlauchende dringt tief in die spaltenförmige Kluft zwischen den gewölbten Oberhautzellen ein. Eine das Keimschlauchende umgebende Strahlenkrone deutet wohl mit Sicherheit auf eine Einwirkung des Pilzes auf die Zellwand des Wirtes hin. Dennoch sah ich den Pilz nie auf diese Weise weiter in die Pflanze eindringen. Nur ein einziges Mal zeigte sich mir dagegen das folgende Bild (Fig. 23): Hier ist die, auf einer Spaltöffnung liegende, Spore mit ihrem Keimschlauch ganz offenbar durch die Öffnung in die Interzellulargänge unmittelbar unterhalb der Epidermis eingedrungen. Wenn es mir auch nicht gelang, ähnliche Bilder öfter zu Gesicht zu bekommen, so sind vielleicht die Verhältnisse in der freien Natur günstiger wie bei meinen Versuchen, und es ist vielleicht garnicht unmöglich, daß auf diese Weise gelegentlich eine erfolgreiche Infektion zustande kommt. Die experimentelle Prüfung der Frage, ob die unter gänzlicher Wasserbedeckung mit einfachem Schlauch keimenden Sporen von *Endophyllum Sempervivi* auch imstande sind, eine Krankheitserscheinung des Wirtes, d. h. ein Wiederauftreten der Sporenbecherchen an den Blättern zu bewirken, scheiterte an der Unmöglichkeit, das xerophile *Sempervivum* längere Zeit unter Wasserbedeckung am Leben zu erhalten.

II. Die Einwirkung des *Sempervivumroste* auf die Wirtspflanze.

Im Gegensatz zu den Barys Beobachtungen sterben nach Hoffmann¹⁾ die pusteltragenden *Sempervivum tectorum*-Pflanzen



Fig. 1. Pflanze von *Sempervivum tectorum* mit einem durch *Endophyllum Sempervivi* infizierten Sproß (links oben). K. Ludwigs phot.

Jahr für Jahr jedesmal im Frühjahr neue Pykniden und Aecidien erzeugt. Damit sind dem *Sempervivumroste* weit größere Verbreitungsmöglichkeiten gegeben, und die Infektionsgefahr für die Wirtspflanze erheblich gesteigert.

¹⁾ a. a. O. p. 144.

noch im selben Jahre ab und zwar mäßig stark infizierte Individuen schon nach einigen Wochen. Sind jedoch nur sehr wenige Blätter der Wirtspflanze infiziert, so lebt sie zwar noch längere Zeit weiter, geht aber schließlich (im August oder September desselben Jahres) doch noch zugrunde. Da nach meinen oft wiederholten Keimungsversuchen die in den vertrocknenden Aecidien verbleibenden und sonstwie an der Pflanze noch haftenden Sporen alsbald ihre Keimkraft verlieren, also zur Überwinterung gänzlich untauglich sind, so würde danach der Pilz nur je einmal in der Form des nach der Neuinfektion in der Wirtspflanze verborgenen Mycel überwinteren. Tatsächlich hat der Pilz jedoch ein in der Nährpflanze perennierendes Mycel, das

Unter Umständen kann man im Sommer an der mehrjährig-kranken Pflanze folgende Zonen unterscheiden: Zu unterst die langen, braunwelken, mit Pustelnarben versehenen Blätter des vorjährigen Frühlings, darüber die welken, normal gestalteten Sommer- und Herbstblätter des vergangenen Jahres ohne Pusteln; dann die gelben, verwelkenden, länglichen pusteltragenden Blätter des diesjährigen Frühjahrs, die weit kleiner als die entsprechenden vorjährigen Blätter sind, und schließlich der grüne, zentrale normal gestaltete Sproß.

Daß nun die Wirtspflanze überhaupt dennoch unter dem Einflusse des Pilzes abstirbt, kann wohl nicht fraglich sein. Der Termin ihres Todes kann aber je nach den günstigeren oder ungünstigeren Ernährungsverhältnissen mehr oder weniger weit hinausgeschoben werden, und in der Regel geht sie erst nach mehrjähriger Erkrankung zugrunde. Das frühe Eingehen der Hoffmannschen Versuchspflanzen dürfte vielleicht auf besonders ungünstige Ernährungsverhältnisse zurückzuführen sein. Daß die Nährpflanze stark unter der Okkupation des Pilzes zu leiden hat, geht offensichtlich aus der allmählichen

Größenabnahme der Sprosse und Blätter hervor (Zwergform, Hungerform), wie sie durch die in Figur 32 u. 33 gegebene

Nebeneinanderstellung klar hervortritt. Es sind hier natürlich keineswegs etwa extreme Formen wiedergegeben, sondern mit Bedacht jeweils die typische Durchschnittsgröße ausgewählt worden.

Das Absterben der Pflanze bezieht sich immer nur auf den infizierten Hauptsproß, die

jungen Ausläuferpflänzchen — darin stimmen meine Beobachtungen mit denen von Hoffmann überein — bleiben überhaupt gesund, wenigstens in der ganz überwiegenden Regel. Wenn Hoffmann meint, daß der Pilz nur im Anfang des Frühjahrs, wenn die Blätter noch sehr langsam wachsen, mit deren Entwicklung Schritt halten kann und daher nur in diesen sich ausbreitet und Fruchtlager erzeugt, während die Sommerblätter des Wirtes gesund bleiben, so gilt dasselbe vermutlich in noch höherem Grade von den schnell wachsenden fadenförmigen Ausläuferachsen. Die schnelle Streckung dieser Achsen dürfte es in der Tat den auf vegetativem Wege entstehenden Tochterpflänzchen ermöglichen, dem Schmarotzer zu entfliehen.

Von diesem Gesichtspunkte aus ist es interessant und bemerkenswert, daß die Ausläuferbildung bei der kranken Pflanze in einer von der Norm



Fig. 2. Von einer gesunden, normal belichteten *Sempervivum* pflanze ausgehende Sproßkolonie. Etwa halbe natürliche Größe.

nicht unwesentlich abweichenden Weise vor sich geht. Die gesunde Pflanze des normalen Standortes entwickelt nur relativ kurze Ausläuferachsen, die es den jungen Rosettenpflänzchen eben ermöglichen, seitlich unter den Blättern der Mutterpflanze hervorzuschauen. Auf diese Weise entsteht bei reichlicher Sproßbildung eine dicht geschlossene Polsterform (Fig. 2). Ganz anders bei der infizierten Pflanze: Die Ausläuferknospen bilden nur eine durch relativ bedeutend längere Ausläuferachsen zustandekommende offene Strahlenform mit der Mutterpflanze im Zentrum (vgl. Fig. 3).

Es geht freilich nicht an, in der letzteren Art der Ausläuferbildung eine im Kampfe mit dem Schmarotzer entstandene vorteilhafte Anpassungserscheinung der *Sempervivum*-pflanze zu erblicken. Denn unter besonderen Umständen kommt auch bei der nicht infizierten Pflanze eine ähnliche Art der Ausläuferbildung zustande. So sind bei sehr kräftigem Wachstum des Hauptsprosses, und wenn dieser bereits von fast ausgewachsenen Aussprossungen umgeben ist, die im zweiten Jahre gebildeten Ab-

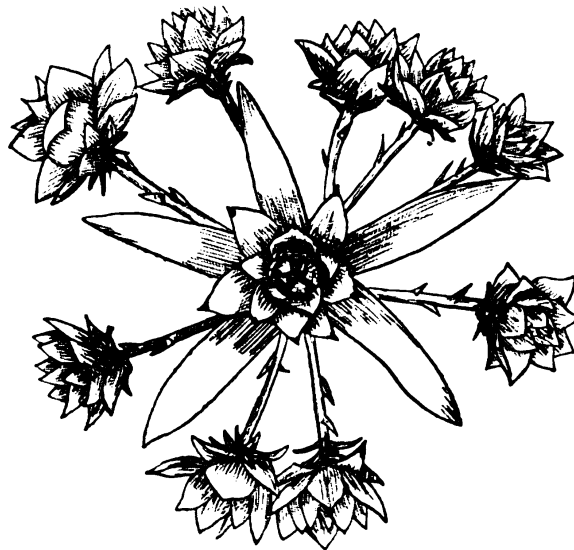
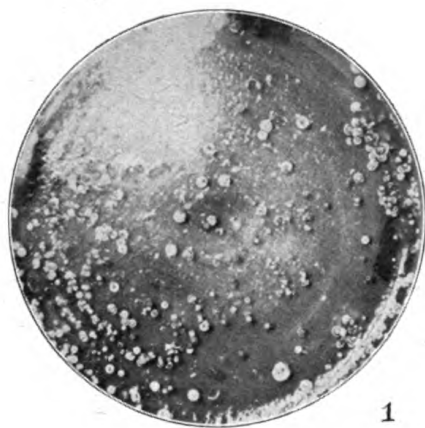


Fig. 3. Von einer infizierten *Sempervivum*-pflanze ausgehende Sproßkolonie. Etwa halbe natürliche Größe.

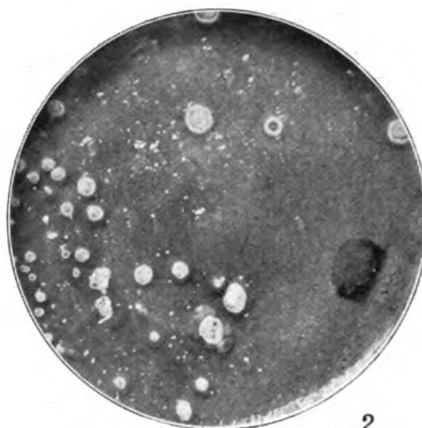
zweigungen gezwungen, sich an ebenso langen Ausläufern, wie sie bei infizierten Pflanzen sich zeigen, vorzuschieben, um überhaupt den Rand der Mutterpflanze und damit Luft und Licht zu erreichen. Man sieht dann auch die Ausläufer zunächst als vollkommen geile Sprosse im Dunkeln unter den großen Blättern der Hauptwie der erstjährigen Seitensprosse dahinkriechen, bis sie schließlich, den äußeren Rand jener erreichend, ein Blattknöspchen auszubilden beginnen. Auch die gesunde, längere Zeit im Schatten gehaltene Pflanze entsendet etwa ebenso lange Ausläuferachsen, wie die kranke. Ebenso

beobachtete ich an einer, durch wiederholte Entnahme einzelner Blätter zu Infektionsversuchen stark geschädigten *Sempervivum*-Pflanze Sproßbildung an stark verlängerten Ausläufern, ein der durch Infektion geschädigten Pflanze wohl sehr nahestehender Fall.

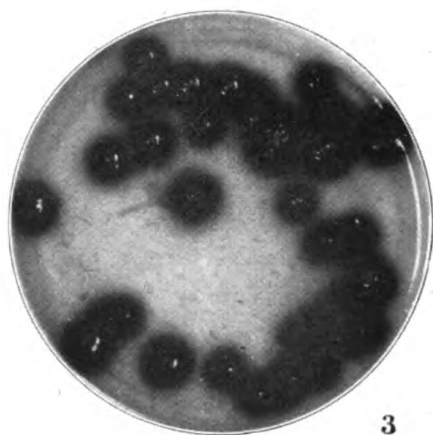
Wir sehen also die Verlängerung der Ausläuferachsen immer dann eintreten, wenn die Pflänzchen sich in ungünstiger Lage befinden, sei es, daß sie von der Mutterpflanze und älteren Sprossen derselben zu sehr beschattet werden, oder der Standort an sich ein zu schattiger ist, oder daß die Mutterpflanze, infolge einer auf die eine oder andere Weise zustande gekommenen Schwächung, ihnen nicht in sehr reichlicher Menge Nahrung zuleiten kann. In allen diesen Fällen sucht das durch vegetative Vermehrung zustande kommende Sproßpflänzchen sich der Umgebung der Mutterpflanze möglichst zu entziehen. Daß es ihm dabei in manchen Fällen glücken wird, einen weniger ungünstigen Standpunkt zur Einwurzelung zu erreichen, ist wohl nicht zu bezweifeln und wird durch die gegebenen Beispiele zum Teil direkt be-



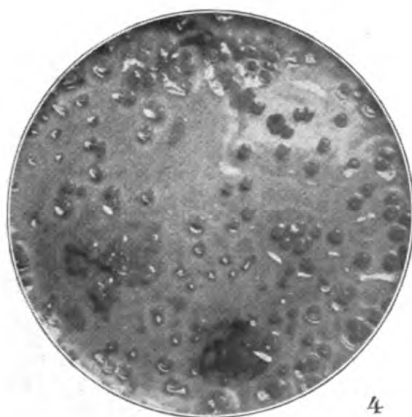
1



2



3



4



5

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

wiesen. Damit scheint mir aber auch die Berechtigung gegeben, in der geschilderten Art der Ausläuferbildung ganz allgemein eine — übrigens in dieser oder mehr oder weniger verschiedener, ökologisch aber ähnlicher Form im Pflanzenreich bekanntlich außerordentlich verbreitete — vorteilhafte Anpassungsfähigkeit zu sehen, die auf die verschiedenartigsten Reize hin zur Entwicklung gelangt.

Daß im Falle der mit *Endophyllum* infizierten Pflanze die Ausläuferpflänzchen wirklich nur durch die starke Streckung ihrer Achsen von dem Schmarotzer freikommen, scheint mir aus einigen Ausnahmefällen klar hervorzugehen: Eine kranke Pflanze hat 9 Ausläuferpflänzchen gebildet und zwar alle bis auf eine an langgestreckten Achsen; diese eine zeichnet sich durch besondere Größe von den anderen aus, ist daher vielleicht schon weit älter und vor der Infektion der Mutterpflanze dieser entsprossen. Dieser große, kurzgestielte Sproß zeigte nun ganz am Schlusse der Fruchtzeit des Pilzes an drei kaum in ihrer Gestalt veränderten Blättern einen bis einige Aecidienbecher. In einem zweiten Falle war die Infektion eines in analoger Weise sich von den übrigen Ausläufern unterscheidenden Sprosses noch geringer geblieben: nur ein Blatt des Pflänzchens zeigte sich gebleicht und ließ an seiner Spitze einige Pykniden erkennen. Es dürfte aus diesen zwei Beispielen wohl hervorgehen, daß es dem Pilz nicht leicht ist, sich in die Ausläuferpflänzchen auszubreiten, und daß nur in für ihn besonders günstigen Fällen ihm dieses in bescheidenem Maße und unter großem Zeitverlust gelingt. Damit leuchtet aber ohne weiteres der große Vorteil der gestreckten Ausläuferachsen für die jungen *Sempervivum*pflänzchen ein.

III. Spezielle Beurteilung der Blattdeformationen der Wirtspflanze.

Daß *Endophyllum Sempervivi*, abgesehen von unmittelbar durch die starke Ausbreitung des Pilzes bei seiner Fruchtbildung hervorgerufenen lokalen, sehr erheblichen, z. T. rein mechanischen, Zerstörungen und Veränderungen des Wirtsgewebes: Verdrängung, Schrumpfung und Bräunung der Zellen, Quellung der Zellwände, die Nährpflanze in auffallender Weise deformiert, ist der rein äußeren Erscheinung nach hinreichend bekannt (Textfig. 1). Es lohnt sich aber, etwas näher auf die Art und die unmittelbaren Ursachen der morphologischen und anatomischen Veränderungen einzugehen. Ruth Stämpfli hat zwar bereits einen Vergleich zwischen dem vom unseren Pilze befallenen und dem gesunden Blatte von *Sempervivum montanum* L. angestellt¹⁾. Doch geht aus den kurzen Ausführungen nur soviel mit Sicherheit hervor, daß das infizierte Blatt dicker als das normale ist und eine Zunahme in Zahl und Größe der Parenchymzellen zeigt, was, wie wir sehen werden, auch mit meinen Ergebnissen bei *Sempervivum tectorum* übereinstimmt.

Es schien nun von Interesse zu untersuchen, ob und inwieweit die durch den Pilz verursachten Veränderungen in der Blattgestalt der Wirtspflanze auch durch andere, auf die Gesamternährung der Pflanze einwirkende Ursachen hervorgerufen werden können und inwiefern die anatomische Struktur an der Veränderung mitbeteiligt ist. Es wurden daher mit *Sempervivum tectorum* Kulturen angestellt:

¹⁾ Stämpfli, Ruth, Untersuchungen über die Deformationen, welche bei einigen Pflanzen durch Uredineen hervorgerufen werden. (Hedwigia. Bd. 49. 1910. p. 230—267; p. 252/53 *Endophyllum*.)

- a) In dauerndem Schatten,
- b) unter feuchter Glasglocke,
- c) in halbdunklem Raume, und die von derart behandelten Pflanzen gewonnenen Blätter mit normalen und den pilzkranken verglichen.

In der äußeren Gestalt und Größe zeigen die letzteren eine auffallende Ähnlichkeit mit den Schattenblättern (vgl. Fig. 33 u. 37). Statt des gedrungenen, spatelförmigen Umrisses des normalen Lichtblattes (Fig. 31) hat das Blatt eine längliche lanzettliche Gestalt angenommen. Das typische Pilzblatt zeigt sogar die äußeren Charaktere des Schattenblattes noch erheblich gesteigert; es ist noch bedeutend länger und ausgesprochener lanzettförmig als jenes (Fig. 32 u. 37)¹⁾. Im Querschnitt zeigen die dreierlei Blätter keine erheblichen Verschiedenheiten. Das Schattenblatt fällt durch eine leichte Wölbung der Blattoberseite auf, die beim pilzbefallenen Blatte nicht beobachtet wurde. Letzteres (in der Form Fig. 32) hat mit 5 mm den größten Durchmesser; das Schattenblatt kommt ihm nahe.

In der anatomischen Struktur zeigt das Lichtblatt einige xerophile Charaktere, die beim Schatten- wie Pilzblatte fehlen oder doch in erheblich abgeschwächtem Maße auftreten. Bei den in dichten Rosetten mehr oder weniger aufrecht stehenden Lichtblättern ist die Epidermis der stärker exponierten Unter-(Außen-)Seite mit wesentlich dickerer Außenhaut versehen wie die der Blattoberseite. Die Dicke der Außenwand der Epidermiszellen beträgt an der Blattoberseite $5\frac{3}{4}$ — $7\frac{1}{2}$ μ , an der Blattunterseite dagegen im Durchschnitt $9\frac{1}{2}$ μ . Bei den sich weit ausbreitenden Schattenblättern ist das Verhältnis auf beiden Blattseiten ungefähr gleich, und die Epidermisaußenwandung erreicht mit $3\frac{3}{4}$ — $5\frac{3}{4}$ μ im Maximum nur die Minimaldicke der betreffenden Zellwände auf der weniger geschützten Blattoberseite des Lichtblattes. Beim pilzbefallenen Blatte finden wir etwa das Gleiche wie beim Schattenblatt: Außenwandung der Epidermis der Blattoberseite im Durchschnitt $3\frac{3}{4}$ μ , der Blattunterseite $4\frac{3}{4}$ μ . (Vgl. Fig. 24 u. 29.)

Auch der Blattrand zeigt beim Lichtblatte in der Regel eine besondere mechanische Schutz Einrichtung, die bei den beiden letztgenannten Blattformen fehlt: Auf dem Querschnitte des Lichtblattes sehen wir an den zwischen den einzelnen Haaren des Randes gelegenen Stellen eine dickwandige Zelle sich zwischen die von beiden Blattseiten zusammentretenden Epidermiszellen einkeilen, dadurch die Blattkante erheblich verstärkend. Beim Schatten- wie pilzbefallenen Blatte dagegen reichen die chlorophyllführenden, zartwandigen Mesophyllzellen bis unmittelbar in den von den beiderseitigen Epidermen gebildeten Winkel hinein. (Vgl. Fig. 25 u. 30.)

Die Sommerblätter, d. h. die nicht mehr Accidien und Pykniden erzeugenden Blätter der pilzbefallenen, ausdauernden Pflanze gehen annähernd wieder in die Ursprungsform zurück (Fig. 34). Dementsprechend ist auch der anatomische Bau wieder dem Lichtblatte ähnlicher: Außenwandung der Epidermiszellen auf der Blattoberseite $4\frac{3}{4}$ μ , auf der Unterseite $7\frac{1}{2}$ μ ; in der Blattkante hat die Winkelzelle etwas verdickte Wandungen. Auch die beim normalen Lichtblatte von einem Anthozyanmantel (roter Zellsaft der Epidermiszellen) umgebene Blattspitze ist beim Sommerblatt der pilzbefallenen Pflanze wieder, wenngleich in schwächerer Ausbildung, vorhanden. Sie fehlt dem pusteltragenden wie dem Schattenblatte.

¹⁾ Auch das Feuchtblatt wie das im Halbdunkel kultivierte ähneln in der Form dem Schattenblatte, doch sind beide erheblich kleiner.

Gehen somit dem Aecidien tragenden Blatte der kranken Pflanze diejenigen Merkmale ab, die das Blatt der normalen Rosettenpflanze als offene Anpassungserscheinungen an den trockenen, gutbelichteten Standort aufweist, so fehlen ihm andererseits auch wieder Eigenschaften, die beim Blatte der Schattenpflanze ihren besonderen Standortsverhältnissen entsprechend nur als vorteilhafte gedeutet werden können.

Auffallend ist die Chlorophyllarmut des kranken Blattes, die ohne weiteres durch die Färbung hervortritt, während das Schattenblatt durch ein intensives Tiefgrün des äußeren frei vorragenden größeren Blatteiles auch gegenüber dem Sonnenblatt ausgezeichnet ist. In ursächlichem Zusammenhange hiermit steht wohl zweifellos die erhebliche Vermehrung der Spaltöffnungen, sowie die im gleichen Schritt damit einhergehende der Gerbstoffbehälter beim Schattenblatte.

Die im gleichen Gesichtsfelde des Mikroskopes (= 1,54 qmm), an gleichwertigen Stellen der Blätter an Ober- und Unterseite gezählten Spaltöffnungen ergaben für die verschiedenen Formen folgende Durchschnittszahlen:¹⁾

Blattform	Zahl der Spaltöffnungen	
	Blattoberseite	Blattunterseite
Lichtblatt	43	34
Schattenblatt	74	66
Feuchtblatt	41	35
Wenig verdunkeltes Blatt	30	22
Aecidien tragendes Blatt } der kranken Pflanze	18	21
Sommerblatt	40	22

Es braucht kaum besonders gesagt zu werden, daß bei einer bekanntlich so variablen Pflanze alle die angegebenen Zahlen keinen absoluten Wert beanspruchen können, sondern nur die Richtung der Variation in einiger Deutlichkeit zu veranschaulichen vermögen.

Die nicht wesentlich von den Zellen der Umgebung verschiedenen Gerbstoffbehälter des Blattes von *Sempervivum tectorum* sind im unteren Blatteile etwas gestreckt (strichförmig), im oberen mehr rundlich. Sie wurden durch längeres Einlegen der ganzen Blätter in Eisensulfatlösung kenntlich gemacht, wobei schon von Anfang an die unverhältnismäßig kräftige Reaktion beim Schattenblatte auffallend hervortrat. Die Behälter sind hier außerordentlich dicht verteilt, besonders noch im obersten Drittel des Blattes, wo auch der stärkste Chlorophyllgehalt konstatiert wurde, und wo die Gerbstoffbehälter fast aneinander stoßen. Beim normalen Lichtblatte sind sie besonders zahlreich und groß in zwei von unten her gegen den beiderseitigen Rand, an der breitesten Stelle des spatelförmigen Blattes, divergierenden Zonen. Beim pusteltragenden Blatte der kranken Pflanze sind die einem kleinen Stecknadelkopf an Größe etwa gleichkommenden Gerbstoffbehälter gleichmäßig und locker über das ganze Blatt verteilt. Die Zwischenräume betragen etwa das Doppelte bis Vierfache des Durchmessers der Behälter. Dichter stehen sie oft an den Aecidiengruppen, zumal in der Blattspitze. Das pustelfreie Blatt der kranken Pflanze ähnelt in bezug auf die Führung von Gerbstoffzellen dem normalen Lichtblatte.

¹⁾ Die Form der Spaltöffnungen mit den charakteristisch angeordneten Nebenzellen erleidet auch beim kranken Blatte keine Veränderung.

Um einen besseren Vergleich zwischen den verschiedenen Blattformen in bezug auf die Verteilung der Gerbstoffbehälter zu ermöglichen, wurden die letzteren jeweils entlang der, durch die Kante eines fest aufgedrückten Deckglases markierten, Mittelquerlinie des Blattes bei durchfallendem Lichte gezählt. Diese Zählung ergab folgendes:

Blattform	Zahl der Gerbstoffbehälter
Lichtblatt	33
Schattenblatt	48
Feuchtblatt	24
Wenig verdunkeltes Blatt	22
Aecidien tragendes Blatt } der kranken	20
Sommerblatt } Pflanze	33

Der Verlauf und die Anordnung der Gefäßbündelstränge sind bei den verschiedenen Blattformen keinem wesentlichen Wechsel unterworfen. Es treten bei allen neben dem medianen Hauptgefäßbündel jederseits zwei Nebenbündel in die Blattbasis ein, denen sich häufig noch auf jeder Seite ein weiterer zarter Strang zugesellt. Auffallend ist bei dem kranken Blatte die lichte Verzweigung des Gefäßbündelsystems.

Was schließlich die Ausbildung des auf dem Blattquerschnitte aus reihenförmig und nach den Rändern radial divergierend angeordnet erscheinenden, in den mittleren Teilen des Blattes sehr großlumigen Zellen (Wassergewebe) bestehende Mesophyll angeht, so wurden beim Lichtblatte in der oberseitigen Blatthälfte im Durchschnitt 9 Zellen in den mittleren Zellreihen gezählt, wovon die 2.—3. von innen die größten sind, während in der unterseitigen Blatthälfte 10 Zellen in der Reihe enthalten waren, mit den großlumigsten an 2.—4. Stelle. Das Schattenblatt zeigte 10—11 in der oberseitigen und 11 in der unterseitigen Blatthälfte, wovon jeweils die 3.—5. den größten Umfang aufwiesen. Beim Aecidien tragenden Blatt waren es 10—11 oberseits und 12 Zellen unterseits, jeweils die 3. und 4. am größten; beim Sommerblatt der kranken Pflanze sind die entsprechenden Zahlen ober- wie unterseits 9—10, wovon die 3.—4. oder 2.—4. Zelle am größten.

Für das Lumen der bezeichneten größten Zellen des Mesophylls wurden auf dem Blattquerschnitt folgende Durchschnittszahlen bestimmt:

Lichtblatt	273 × 232 μ
Schattenblatt	200 × 177 μ
Feuchtblatt	191 × 173 μ
Aecidien tragendes Blatt	364 × 264 μ
Sommerblatt der kranken Pflanze	300 × 173 μ

Das pusteltragende Blatt vom Typus der Figur 32 fällt dabei durch die erheblichste Vergrößerung (Hypertrophie) der Parenchymzellen auf.

Im anatomischen Bau der Achse konnten keinerlei bemerkenswerte Unterschiede an der kranken Pflanze gegenüber der normalen festgestellt werden, abgesehen von der auffallend schwachen Ausbildung des Stengels bei mehrjährig-kranken Individuen.

Wenn wir jetzt mit der Kenntnis der im Vorigen zusammengestellten Daten versuchen, uns ein Bild von dem Zustandekommen der Formverände-

rungen des infizierten Blattes zu machen, d. h. die unmittelbareren Ursachen der letzteren festzustellen versuchen, so scheint es mir zunächst nicht zweifelhaft, daß wir im wesentlichen eine *Hemmungsbildung* vor uns haben. Das Fehlen derjenigen äußeren und inneren Merkmale, welche dem normalen Lichtblatte von *Sempervivum tectorum* in ganz offener Anpassung (xerophiler Bau) an die normalen Standortverhältnisse zukommen, und die äußere Ähnlichkeit des infizierten Blattes mit den jugendlichen Blattformen der Pflanze, wie sie uns als Niederblätter an den Sproßindividuen und in noch klarerer Wiederholung als Hochblätter (Fig. 35 u. 36, welche die ganze Variationsbreite des Hochblattes demonstrieren) am Blütenstande entgegentreten, das stärkere Hervortreten des parenchymatischen Elementes und die Armut an Chlorophyll sprechen für diese Ansicht. Auch die beim Schattenblatte¹⁾ eintretende Vermehrung der Spaltöffnungen und die anderen genannten Eigentümlichkeiten dieser Blattform, die uns im Hinblick auf die besonderen Standortverhältnisse ganz unbedingt als vorteilhafte erscheinen müssen, fehlen dem Aecidien tragenden Blatte ebenso, wie irgendwelche anderen, etwa als Anpassungen zu deutende Erscheinungen. Die Schattenpflanze erweckt damit in der gegebenen Form noch den Eindruck einer normalen Pflanze, die in Harmonie mit der Umgebung sich befindet. Anders die durch Kultur im feuchten Raume und die im halbverdunkelten Raume gezogenen Blattformen. Sie können ebenso wie das pusteltragende Blatt nur als Hemmungsbildungen aufgefaßt werden, hervorgerufen durch ungünstige Beeinflussung der Vegetationsbedingungen²⁾.

In einer Beziehung unterscheidet sich allerdings das kranke Blatt nicht unwesentlich vom Feucht- wie Dunkelblatte: Sind letztere in ihrer Größe dem normalen Lichtblatte gegenüber zurückgeblieben, so übertrifft das kranke Blatt sogar das Schattenblatt nicht unerheblich an Größe (Fig. 32 u. 37). Diese Vergrößerung des Blattes kommt durch eine geringe Zunahme in der Zahl, vornehmlich aber durch Vergrößerung der Grundgewebszellen zustande. Wir können in dieser, im Vergleich mit zahlreichen anderen Gallenbildungen nicht sonderlich weit getriebenen, Hypertrophie einstweilen nur eine Wachstumsreaktion der Wirtspflanze auf die von dem Schmarotzerpilz ausgehenden Reize erblicken, ohne über den ernährungsphysiologischen Zusammenhang irgendetwas zu wissen. Auffallend und interessant ist es, daß diese Hypertrophie des Grundgewebes bei der mehrjährig-kranken Pflanze so gut wie ganz verschwindet (Fig. 33). Mag die Pflanze bei der langdauernden Infektion allmählich sich, wenn man so sagen darf, an den parasitären Reiz gewöhnt haben und ihn nicht mehr als solchen empfinden, oder mag sie im Laufe der Zeit so sehr geschwächt worden sein, daß sie einer durch gesteigertes Wachstum sich äußernden Reaktion nicht mehr befähigt ist.

Diese Hypertrophie des Grundgewebes war wie gezeigt durch andere als parasitäre Beeinflussungen nicht zu bewirken. Man könnte bei der Natur des fraglichen Gewebes als „Wassergewebe“ leicht an die von *Küster*³⁾ als Osmomorphose bezeichnete Veränderung denken, die nach ihm auf osmotische Störungen bei Aufenthalt der Pflanzen in feuchter Luft usw. zurück-

¹⁾ Über Schattenblätter und Jugendformen vgl. *Schramm*, R., Über die anatomischen Jugendformen einheimischer Holzpflanzen. (Flora. 1912. p. 225—295.)

²⁾ *Göbel*, Über Jugendformen von Pflanzen und deren künstliche Wiederher-vorrufung. (Sitzungsber. Akad. d. Wiss. München, math. phys. Kl. 1896; Derselbe, Organographie der Pflanzen. Jena 1898. p. 124, 148, 581.)

³⁾ *Küster*, Die Gallen der Pflanzen. Leipzig 1911. p. 261.

zufahren ist. Es mag daher besonders hervorgehoben werden, daß im Gegensatz dazu gerade bei der Kultur der *Sempervivum* pflanze im feuchten Raume das Grundgewebe des Blattes sowohl in der Zahl der Zellen wie in der Größe derselben am meisten zurücksteht. Es ist dieses auch nur verständlich im Hinblick auf die normale, trocken stehende Pflanze mit dem zu ihrem xerophilen Charakter gehörigen, gut ausgebildeten Wassergewebe.

Wir gelangen also zu der Vorstellung, daß die durch *Endophyllum Sempervivi* an der Wirtspflanze hervorgerufene Formanomalie im wesentlichen einen Rückschlag in die phylogenetisch ältere, weniger stark differenzierte „Jugendform“ darstellt (Hemmungsbildung), wie sie auch durch anderweite (nicht parasitäre) ungünstige Beeinflussungen künstlich hervorgerufen werden kann, und daß daneben, als spezifische, unmittelbare Wirkung des Pilzes, ein über das normale Maß gesteigertes Wachstum der Grundgewebszellen eintritt (Hypertrophie), das sich in einer mehrjährigen Zeitspanne allmählich wieder verliert.

Gallen mit den Charakteren der Jugendformen sind vielfach beobachtet worden, auch solche, die durch Uredineen hervorgerufen werden¹⁾. Nach W. Müller²⁾ sind auch die von *Endophyllum Euphorbiae silvaticae* (DC) Winter an der Wirtspflanze hervorgerufenen Umgestaltungen den Verhältnissen gesunder Jugendstadien sehr ähnlich. Daneben wird auch hier vom Pilze in den befallenen Teilen der Nährpflanze eine Vergrößerung der Zellen bewirkt.

Daß bei der von *Endophyllum Sempervivi* infizierten Pflanze die Beeinflussung durch den Pilz nicht sehr weit geht, wird dadurch augenscheinlich, daß nur diejenigen Blätter, in denen sich der Schmarotzer weit hin ausbreitet und Pykniden und Aecidien anlegt, die Formanomalien zeigen, während die nachkommenden Blätter (Sommerblätter), wie wir gesehen haben, den Blättern der normalen, gesunden Pflanze wieder fast vollkommen gleich sind. Die deformierten Blätter treten daher an der Wirtspflanze nur während der nur wenige Wochen dauernden Zeit der Aecidienbildung des Pilzes im Frühjahr auf, während die Pflanze vorher und nachher äußerlich normal erscheint. Einmal beobachtete ich sogar das Ausbleiben der Formveränderung an den pusteltragenden Blättern eines seitlichen Ausläufersprosses, der erst ganz am Schlusse der Fruchtzeit des Pilzes einige wenige Aecidien an einigen Blättern in Erscheinung treten ließ.

Zusammenfassung.

Die wichtigsten Resultate der vorliegenden Untersuchung lassen sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Neben der typischen, in der Bildung von Promycelien mit Sporidien bestehenden Keimung tritt bei *Endophyllum Sempervivi* bei reichlicher Wasserbedeckung der Sporen eine Keimung mit einfachem Keimschlauche auf.

2. Diese Keimschläuche versuchen in das Gewebe der Wirtspflanze einzudringen. Ob durch dieselben eine Er-

¹⁾ Küster, Die Gallen, p. 267; Wakker, J. H., Über den Einfluß parasitischer Pilze auf ihre Nährpflanzen. (Jahrb. f. wiss. Botan. Bd. 24. 1892. p. 499—548.)

²⁾ Müller, W., Der Entwicklungsgang des *Endophyllum Euphorbiae silvaticae* (DC) Winter und der Einfluß dieses Pilzes auf die Anatomie seiner Nährpflanze *Euph. Amygdaloides*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1908. p. 333—341.)

krankung der Nährpflanze hervorgerufen wird, konnte bei der Empfindlichkeit der letzteren gegenüber einer Wasserbedeckung experimentell nicht entschieden werden.

3. Der Pilz perenniert in der Wirtspflanze und bringt in jedem Frühjahr die Krankheitserscheinung mit seinen Fruchtlagern an derselben hervor.

4. Die Wirtspflanze wird im Laufe der Jahre mehr und mehr durch den Pilz geschwächt, was sich äußerlich durch die Größenabnahme deutlich kennzeichnet, und geht schließlich zugrunde.

5. Die von der infizierten Pflanze gebildeten jungen Ausläuferpflänzchen vermögen in der weit überwiegenden Regel durch starke Streckung ihrer Achsen sich dem Pilze zu entziehen und bleiben gesund.

6. Diese starke Verlängerung der Ausläufersproßachsen tritt bei nicht infizierten Pflanzen nur unter besonderen, ihre Ernährung ungünstig beeinflussenden Verhältnissen ein.

7. Die durch den Pilz an der Wirtspflanze hervorgerufene Blattdeformation ist als ein Rückschlag in die weniger stark differenzierte Jugendform aufzufassen, als Hemmungsbildung, wie sie auch durch anderweitige ungünstige Beeinflussungen künstlich hervorgerufen werden kann.

8. Daneben tritt, als spezifische Wirkung des Pilzes, eine Hypertrophie des Grundgewebes ein, die sich jedoch bei der mehrjährig-kranken Pflanze mehr und mehr wieder verliert.

Literatur.

- de Bary, A., Untersuchungen über die Entwicklung einiger Schmarotzerpilze. (Flora. Bd. 46. 1863. p. 177.)
 — Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bakterien. 1884. § 79—83.
 Blackman, V. H., On the fertilization, alternation of generations and general cytology of the Uredineae. (Ann. of Bot. Vol. 18. 1904. p. 323—373.)
 Christmann, A. H., Sexual reproduction in the rusts. (Botan. Gaz. Vol. 39. 1905. p. 267—274.)
 — The alternation of generations and the morphology of the sporeforms in the rusts. (Bot. Gaz. Vol. 44. 1907. p. 81—101.)
 Dietel, P., Uredineae. (Engler und Prantl, Pflanzenfamilien. T. I. Abt. I**. 1900.)
 — Versuche über die Keimungsbedingungen der Teleutosporen einiger Uredineen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. p. 95—106.)
 Fischer, E., Über die durch parasitische Pilze (besonders Uredineen) hervorgerufenen Mißbildungen. (Verhandl. d. schweizer. naturf. Gesellsch. Jahresversaml. 89 in St. Gallen. 1907. p. 170—177.)
 Göbel, K., Über Jugendformen von Pflanzen und deren künstliche Wiederhervorrufung. (Sitzungsber. Akad. d. Wiss. München, math. phys. K. 1896.)
 — Organographie der Pflanzen. Jena 1898.
 Guttenberg, H. von, Beiträge zur physiologischen Anatomie der Pilzgallen. Leipzig 1905.
 Hoffmann, A. H. W., Zur Entwicklungsgeschichte von *Endophyllum Sempervivi*. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. p. 137—158.)
 Hoffmann, J., Beitrag zur vergleichenden Anatomie der Arten der Gattung *Sempervivum*. (Österr. Botan. Zeitschr. Jahrg. XLVI. 1896. p. 305—314.)
 Koch, L., Untersuchungen über die Entwicklung der Crassulaceen. Heidelberg 1879.

- Krieg, W., Über die Ursachen der Spezialisierung und die Entstehung des Wirtswechsels bei den Uredineen. (Naturwiss. Wochenschr. Bd. 7, 1908, p. 561 ff.)
- Küster, Die Gallen der Pflanzen. Leipzig 1911.
- Kursanow, L., Zur Sexualität der Rostpilze. (Zeitschr. f. Bot. Bd. 2, 1910, p. 8—93.)
- Maire, R., L'évolution nucléaire chez les Endophyllum. (Journ. de Bot. T. 13, 1909, p. 80 ff.)
- Müller, W., Der Entwicklungs-gang des Endophyllum Euphorbiae schvaticae. (D. Winter und der Einfluß dieses Pilzes auf die Anatomie seiner Nährpflanze Euph. Amygdaloides. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II, Bd. 20, 1906, p. 333—341.)
- Nybel, P., La germination de quelques Ecdiospores. (Ann. Soc. Belge de Mycol. T. 22, 1898, p. 101—111.)
- Richards, H. M., On some points in the development of the aecidia. (Proc. Amer. Acad. Vol. 31, 1896, p. 255—270.)
- Rob, H., Die Pflanzengallen (Gallien) Mittel- und Nordeuropas, ihre Erreger und Biologie und Bestimmungstabellen. Jena 1911.
- Schönland, S., Crassulaceae. (Engler u. Prantl, Pflanzenfamilien. T. III, Abt. 2a, 1891, p. 23—38.)
- Solender, H., Systematische Anatomie der Dicotyledonen. Stuttgart 1899, p. 32—366.
- Da-selle, Ergänzungsband. Stuttgart 1908, p. 130—131.
- Schramm, R., Über die anatomischen Jugendformen einheimischer Holzpflanzen. (Flora, 1912, p. 225—295.)
- Stämpfli, R., Untersuchungen über Deformationen durch Uredineen. (Hedwigia Bd. 49, 1910, p. 230—267.)
- Wakker, J. H., Über den Einfluß parasitischer Pilze auf ihre Nährpflanzen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 24, 1892, p. 499—548.)

Tafelerklärung.

- Fig. 1: Promycel mit 2 Sterigmen.
- Fig. 2: Ein solches mit 3.
- Fig. 3: mit 4 und
- Fig. 4: mit 5 Sterigmen.
- Fig. 5: Junges Promycel mit Scheidewänden.
- Fig. 6 bis 15 und Fig. 17: Unterwasserkeimung:
- Fig. 6 bis 8: mit einfachen, mehr oder weniger gewundenen, unseptierten Keimschläuchen. Fig. 9 und 11: mit scharfen Windungen. Fig. 10: mit gegabeltem Keimschlauch.
- Fig. 12, 15, 17: korkzieherartige gewunden. Fig. 13: mit blasenartiger Anschwellung an der Basis des Keimfadens. Fig. 14: mit einer Scheidewand.
- Fig. 16, 20 und 22: Keimende Sporidien mit verschieden langem und mit gegabeltem Keimfaden.
- Fig. 18: Promycel mit astartig verlängertem Sterigma.
- Fig. 19: Spore bei Unterwasserkeimung in die Nährpflanze einzudringen versuchend.
- Fig. 21: Sporidien mit in die Oberhautzellen der Nährpflanze eindringenden Keimfaden.
- Fig. 23: Sporenschlauch bei Unterwasserkeimung durch eine Spaltöffnung in der Wirtspflanze eindringend.
- Fig. 24: Epidermiszelle der Blattunterseite der normalen, gesunden Lichtpflanze von *Sempervivum tectorum* im Querschnitt.
- Fig. 25: Querschnitt des Blattrandes bei derselben Pflanze.
- Fig. 26: Promycel mit basalen Windungen.
- Fig. 27: Keimende Sporidien am Promycel.
- Fig. 28: Promycel mit basaler Anschwellung.
- Fig. 29: Epidermiszelle der Blattunterseite der kranken Wirtspflanze im Querschnitt.
- Fig. 30: Querschnitt des Blattrandes bei derselben Pflanze.
- Fig. 31: Normales Lichtblatt von *Sempervivum tectorum*.
- Fig. 32: Krankes Blatt von *Sempervivum tectorum*.
- Fig. 33: Blatt einer mehrjährig-kranken Pflanze von *Sempervivum tectorum*.
- Fig. 34: Nachkommendes Sommerblatt einer infizierten Pflanze.

Fig. 35 und 36: Die extremen Formen der Blätter des Blütenschafes von *S. tectorum*.
Fig. 37: Schattenblatt von *S. tectorum*.

Alle Keimungsfiguren sind in 250- bis 300-facher Vergrößerung gezeichnet; Fig. 25 und 30 in 200-facher und 24 u. 29 in 250-facher Vergrößerung; Fig. 31 bis 37 stellen die natürlichen Größen dar.

Nachdruck verboten.

Sciara nitidicollis Meg. (*Sc. frigida* Wtz.?) = Larven als Schädiger junger Kulturen von *Mesembrianthemum* *pseudotruncatellum* Berger.

Von Dr. O. Oberstein-Breslau.

Mit 2 Figuren.

Sciara larven haben schon des öfteren und aus recht verschiedenen Gründen allgemeineres Interesse wachgerufen.

Über 300 Jahre ist es her, da wurde zuerst 1603¹⁾ von Schwenckefelt²⁾ in Schlesien der Heerwurm, Kriegswurm, Wurmdrache, auch Heerschlange genannt, beobachtet, eine wahre Völkerwanderung von Abertausenden glasartig durchscheinender, grauweißer Mückenlarven von noch nicht Zentimeterlänge, mit schwarzem, hornigem Kopf. Sie bilden in ihrer Gesamtheit einen im Schneckentempo dahingleitenden Strom von bis über 3 m Länge, Daumendicke und etwa Handbreite. Und einer Wellenbewegung vergleichbar, geht es über diese Karawane wandernder Maden dahin, wie über die Oberfläche eines trägen Gewässers. Es braucht wohl nicht erst noch einmal hervorgehoben zu werden, daß gar bald der Aberglaube sich dieser spukhaften Erscheinung bemächtigte, Krieg und Mißernte befürchtend, wenn der Heerwurm bergauf kroch, Frieden und Erntesegen prophezeiend, wenn er talwärts zog. Derjenige schätzte sich auch für seine eigne Person glücklich, wenn der Heerwurm ihm in den Weg geworfenen Kleidungsstücken nicht auswich, denn dieses Ausweichen bedeutete Tod.

Im Lichte der Forschung betrachtet, stellt nun der Heerwurm bekanntlich nichts anderes dar als eine Massenwanderung harmloser Humusbewohner zum Zwecke der Aufsuchung neuer Nahrung, die aus verwesendem Rot- und Hainbuchenlaub sowie Fichtennadeln, aus vermodernden Eichenblättern und Kiefernadeln³⁾ besteht. Der Trieb zur Geselligkeit ist den aus in den Moder abgelegten Eierhäufchen ent schlüpfenden Larven angeboren. Sie ähneln darin den verwandten, freilich bedeutend größeren, braungrauen Haarmückenlarven (*Bibio hortulanus* L.), die bekanntlich ja auch zeitlebens gesellig beisammenbleiben und durch platzweises Benagen der feinen Würzelchen Gartenkulturen und Feldfrüchte nicht eben selten empfindlich schädigen. Demgegenüber sind die Heerwurmmaden aber in keiner Weise schädlich. Zwei bis drei Monate brauchen sie, bis sie ausgewachsen sind. Dann verpuppen sie sich, um in reichlich 8 Tagen die Heerwurm-Trauermücke (*Sciara militaris* Now.) zu liefern, eine nur etwa 3 bis 4 mm große Mücke von trübschwarzer Farbe (Skiaros = schattig). Drei Tage höchstens freuen sich die Imagines des Lebens, dann ist die Ablage der Eier, welche überwintern, erfolgt. Kleinere Heerwurmzüge, die indessen früher im Jahre und mehr in, nicht auf der Laubdecke des Waldbodens wandern, werden wohl auch auf *Sciara gregaria* Beling⁴⁾ zurückgeführt.

¹⁾ Pechuel-Loesche, Brehms Tierleben. IX; Taschenberg, E. L., Insekten. 1892. p. 481 ff.

²⁾ Lampa, Sv., Om härmasken. (Uppsatser i prakt. Entomol. XVII. 1907. p. 79—88; Ref. in M. Hollrungs Jahresber. üb. d. Geb. d. Pflanzenkrankh. X. 1909. p. 48.)

³⁾ Ritzema Bos, J., Tierische Schädlinge und Nützlinge für Ackerbau, Viehzucht, Wald- und Gartenbau. 1891. p. 597.

⁴⁾ Judeich-Nitsche, Lehrbuch d. mitteleuropäischen Forstinsektenkunde. II. 1895. p. 1127.

Bei weitem aber nicht von allen *Sciara*-Spezies, deren Meigen¹⁾ 37 deutsche aufzählt, sind die biologischen Verhältnisse heute bekannt, ja selbst wo dies bisher der Fall zu sein schien, tauchen, wie bei *Sciara piri* Schmidb., der Birntrauermücke, wieder neue Fragen und Zweifel auf. So ist es nach Ew. Rübsaamen²⁾ sehr unwahrscheinlich, daß die Larven der eben genannten, kleinen Birntrauermücke wie die der großen (*Sciara schmidbergeri* Kollar) die primäre Veranlassung einer Schädigung der Birnfürchte sind. Vielmehr sollen sie lediglich Saprophyten abgefallener Früchte darstellen. Auch aus den von Ferraut³⁾ angestellten Zuchtversuchen ergibt sich, daß die parasitären Maden der Birngallmücke (*Contarinia pirivora* Ril.), welche nach Reh⁴⁾ und Kieffer⁵⁾ zudem auch häufig genug mit den *Sciara*-Larven verwechselt werden, erst den Boden für die saprophytisch lebenden Larven der bezüglichen *Sciara*-Spezies vorbereiten, daß also die Birngallmückenmaden die Urheber der Schädigung sind, die Eiablage der Birntrauermücken aber erst in die faulen Stellen der Früchte hinein erfolgt⁶⁾. Eine zweite *Sciara*-Madengeneration soll dann des weiteren auf beliebigen anderen faulenden Pflanzstoffen leben. In den Rahmen dieser neueren Beobachtungen fallen auch noch fernere biologische Daten, nach denen *Sciara nitidicollis* Meig.-Larven, unter anderen Dipterenmaden, zur schnelleren Zerstörung vom sog. Sauerwurm angegriffenen Weinbeeren beitragen sollen⁷⁾. Desgleichen wird von *Sciara vitripennis* Mg. wiederholt berichtet, daß sie sich als Larve in faulen Kartoffeln⁸⁾ sekundär findet, vorzüglich in den Rissen und Löchern beschädigter und faulender Knollen⁹⁾ in Kellern und Gruben, niemals die Veranlassung, wohl aber die Förderer begonnener Kartoffelfäule darstellend. *Sciara praecox* Meig.-Larven sollen nach Kaltenbach¹⁰⁾ gesellig in hohlen, dünnen Distelstengeln leben, die von Zünslerlarven (*Myelois cribrella* Hb.) oder Fliegenmaden (*Cheilosia variabilis* Mg.) u. dgl. ihres Stengelmarks beraubt wurden. Ihre Nahrung besteht dann aus den zermalmten Abfällen, welche jene primären Schädiger hinterließen. — Über *Sciara ligniperda* Br.- und *Sciara socialis* Br.-Larven in morschem Erlenholze finden wir eine kurze Notiz in Judeich-Nitsches klassischem Werke (l. c. II. p. 1128) unter Angabe der Originalliteratur.

Wenn so ein Teil der *Sciara*-Larvenspezies in vielen Fällen ganz gewiß kein eigentliches Schmarotzerdasein führt, stattdessen solche Arten nur mehr oder weniger harmlose Fäulnisbewohner darstellen, gibt es ebenso zweifellos auch parasitär lebende Arten, die Schäden, die in die Tausende von Mark gehen, im Larvenzustand anzurichten vermögen. Den Übergang zu solchen typischen Parasiten werden auch hier Spezies mit fakultativem Parasitismus darstellen, Arten, die, wenn die Lebensbedingungen für sie sehr günstig, für die betreffende Pflanzenart aber ungünstig sind, Schadenwirkungen wahrer Schmarotzer hervorrufen. Als Beispiel hierfür kann *Sciara analis* Egg.

¹⁾ Meigen, J. M., Systemat. Beschreibung d. bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. I. 1851. p. 216—225; Taf. IV. Figg. 1—4, VI. 1830 p. 305—308, VII. 1838. p. 50—51.

²⁾ Taschenberg, O., Schutz der Obstbäume gegen feindliche Tiere. 1901. p. 273.

³⁾ Ferraut, V., Beiträge zur Kenntnis der wahren Birngallmücke. (Allg. Zeitschrift f. Entomol. IX. 1904. p. 298—304; Ref. M. Hollrungs Jahresber. über die Neuerungen und Leistungen a. d. Gebiete d. Pflanzenkrankh. VII. 1905. p. 164/65.)

⁴⁾ Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. XIV. 1904. p. 284.

⁵⁾ Kieffer, Bemerkungen über Adlers Beitrag zur Biologie von *Inostemma Boscii*. (Zeitschr. f. wissensch. Insektenbiol. IV. 1908. p. 465/66; Ref. M. Hollrung, Jahresber. über d. Gebiet d. Pflanzenkrankh. XI. 1910. p. 312.)

⁶⁾ Vgl. auch Schilling, Heinr. Freiherr v., Die Schädlinge des Obst- und Weinbaues. 3. Aufl. v. L. Reh. 1911. p. 58.

⁷⁾ Déresse, A., Contributions à l'étude des mœurs et des procédés de destruction de quelques insectes de la vigne. (Rev. de la stat. vitic. de Villefranche. II. p. 108—120; Ref. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. III. 1893. p. 41.)

⁸⁾ Taschenberg, E. L., Prakt. Insektenkunde. IV. Die Zweiflügler, Netzflügler und Kaukerfe. 1880. p. 35.

⁹⁾ Kaltenbach, J. H., Die Pflanzenfeinde aus der Klasse der Insekten. 1874. p. 454.

¹⁰⁾ Kaltenbach, l. c. p. 381.

angeführt werden. Deren Larve lebt, nach Beobachtungen Del Guercios¹⁾, normalerweise von vermodernder Humussubstanz, greift aber auch lebende Pflanzen an, wenn deren normale Lebenstätigkeit gestört ist, besonders kränkelnde Kleeplanzen.

Im Gegensatz zu solchem Schwächeparasiten ist nun die sog. Pilzmücke, in Frankreich Moucheron²⁾ genannt, *Sciara ingenua* L. D., ein sehr schädlicher Schmarotzer der Champignonkulturen, in welchen Pilzen die Larven ihre Entwicklung durchmachen. Bei frühzeitigem Auftreten können dieselben dann die ganze Ernte illusorisch machen. Besonders in Frankreich stellt diese durch H. Giard bestimmte Diptere bei epidemischem Auftreten mitunter auf Jahre hinaus die Champignonkultur in Frage³⁾. Aber nicht nur in Frankreich ist *Sciara ingenua* L. D. als Champignonfeind in hohem Maße gefürchtet, auch in den Niederlanden⁴⁾ (Valkenburg [Limburg]) haben die schwarzköpfigen Larven einer nicht näher bestimmbar *Sciara*-Art schon sehr großen Schaden in Kulturen von Champignons angerichtet. Desgleichen wurden 1908, nach Angabe der Hamburger Station für Pflanzenschutz, in Wandsbek, Schleswig-Holstein, die Champignonkulturen einer Gärtnerei sehr durch die Larven der zu Tausenden aufgetretenen Pilzmücke *Sciara frigida* Wtz. geschädigt⁵⁾. Eine Champignonzüchterei in Bayern aber hatte 1905 einen Verlust von 18 000 Mark zu verzeichnen, indem, wahrscheinlich mit französischer Brut eingeschleppte, *Sciara*-larven das Pilzmycel vollständig vernichteten⁶⁾.

Daß *Sciara* maden auch wildwachsende Speisepilze in erheblicher Weise zu schädigen vermögen, hatte ich diesen Herbst bei Blutreizkern (*Lactaria deliciosa* L.) zu beobachten, gute Gelegenheit.

Ehe wir nun zu den Gartenkulturen, und so zu unserm eigentlichen Thema übergehen, sei noch referierend zweier Gallbildungen gedacht, die auf *Sciara* larven als Urheber z. T. zurückgeführt werden. Nach Kaltenbach⁷⁾ und Winnertz bewohnt die Larve von *Sciara tilicola* Loew erbsengroße, kugelige, einkammerige Gallen an jungen Lindentrieben, am häufigsten an Stock- oder Wurzeltrieben in geschätzter Lage. Die Frage nach dem eigentlichen Urheber dieser Gallen bleibt aber offen. Es scheint, als ob Kaltenbach das Vorhandensein von *Sciara* als bloßen Raumparasitismus deutete⁸⁾. Direkt als Gallenerzeuger aber wird von G. Del Guercio⁹⁾ eine *Sciara* art bezeichnet. Sie soll auf der Komposite *Santolina chamaecyparissus* L., dem sog. Heiligenkraut, eine holzige, außen ringsum längsgeriefte, abgestumpft spindelförmig gestaltete Knospengalle hervorrufen. Bei Howard¹⁰⁾ wird indessen auch diese, von dem Entdecker als neu angesprochene Galle nicht angeführt.

Was nun die Schädigungen von Gartenkulturen durch *Sciara*-arten anlangt, so finden wir die Ergebnisse diesbezüglicher, bisheriger Beobachtungen

¹⁾ Del Guercio, G., Contribuzione alla conoscenza delle metamorfosi della *Sciara analis* Egger con notizie intorno alla *Sciara analis* Bezzii v. n. ed. ai loro rapporti con alcuni Sporozoi e Entomozoi parassiti. (Redi. II. 1904. p. 280—305; Ref. M. Hollrung, Jahresber. üb. d. Geb. d. Pflanzenkrankh. VIII. 1907. p. 50.)

²⁾ Costantin, J., Le Suisse (*Aphodius fimetarius*). (Bull. Soc. mycol. de France. 1893. p. 84—86; Ref. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. III. 1893. p. 289.)

³⁾ Costantin, J., Sur quelques maladies du blanc de champignon. (Compt. rend. 1892. I. p. 849; Ref. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. II. 1892. p. 366.)

⁴⁾ Ritzema-Bos, J., Kurze Mitteilungen üb. Pflanzenkrankh. u. Beschädig. in d. Niederlanden in d. Jahren 1892 u. 1893. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. IV. 1894. p. 221.)

⁵⁾ Ber. üb. Landwirtsch., herausg. im Reichsamte d. Inn. H. 18. Krankheiten und Beschädigungen der Kulturpflanzen im Jahre 1908, zusammengestellt in der Kais. Biol. Anst. f. Land- und Forstwirtsch. 1910. p. 109.)

⁶⁾ Prakt. Blätt. f. Pflanzenb. u. Pflanzensch. III. 1905. p. 10.

⁷⁾ Kaltenbach, J. H., l. c. p. 78.

⁸⁾ Auch nach Herrn Ew. Rübsaamens Ansicht (Brief vom 20. Okt. d. Js.) sind diese Gallen vielmehr das Produkt der Gallmücke *Contarinia tiliarum* Kieff. Für bezügl. freundlichen Hinweis sage ich an dieser Stelle ergebensten Dank. Siehe ferner Bemerkung in Judeich-Nitsche, l. c. II. p. 1126.

⁹⁾ Del Guercio, G., Intorno ad alcuni cecidii ed ai cecidiozoi della *Santolina*, dei *Dendrobium* e delle *Cattleie*. (Nuovo Giorn. botan. ital. N. Ser. IV. 1897. p. 192—198; Ref. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. VII. 1897. p. 227.)

¹⁰⁾ Howard, C., Les zoécidies des plantes d'Europe et du Bassin de la Méditerranée. II. 1909. p. 975/76.

von Reh¹⁾ zusammengestellt. Unter Hinweis auf die daselbst gegebenen Literaturdaten sei hier der genannte Autor kurz zitiert: „Von dem Dünge“, heißt es da, „gehen die Larven auch an die Wurzeln anderer Pflanzen. Klebahn hat sie beobachtet an kranken Hyazinthen und *Cattleya labiata*, Chittenden an Rosen, Gloxinien, in Blumentöpfen, in Cotyledonen von Erbsen, an Gurken (besonders schädlich in Illinois); Hine an Nelken.“ Über *Sciara* (*giraudi* aff.) als Schädling junger Kakteenkulturen berichtet E. Dams in Bd. 13. 1903. p. 20—23 der Monatsschr. f. Kakteenk.²⁾

Hier schließt sich unsre Beobachtung über *Sciara*-Schädigungen junger *Mesembrianthemum*-pflanzen zwanglos an. Sie wurden an den hochsukkulenten, wie winzige Boviste gestalteten Keimlingen des interessanten *Mesembrianthemum pseudotruncatellum* Berger festgestellt.

Über tierische Schädlinge dieser morphologisch so wunderbar vielgestaltigen, kappländischen Sukkulatengattung ist bisher nicht viel bekannt geworden, noch viel weniger aber von pflanzlichen Parasiten. Lediglich eine Schildlaus (*Pulvinaria mesembrianthemii*) scheint von ersteren wesentlich in Betracht zu kommen³⁾. Auch in den *Mesembrianthemum*kulturen des Kgl. Botanischen Gartens zu Breslau ist sie, neben mancherlei Aphidenspezies⁴⁾, nach meinen Beobachtungen schon recht lästig geworden. Von wirklichen, pilzlichen Parasiten kann aber, soweit ich die Literatur heute übersehe, zurzeit überhaupt keine Rede sein. P. Nypels fand in Belgien⁵⁾ auf *Mesembrianthemum* der Art nach nicht näher bestimmte Sclerotien (*Sclerotinia Libertiana* und *Fuckeliana*). Auf *Mesembrianthemum aequilaterale* beobachtete Mc. Alpine in Australien *Sepatoria confluens* n. sp.⁶⁾. H. Leininger⁷⁾, Heidelberg, fand an toten *Mesembrianthemum*-Sprossen absterbender Pflanzen im dortigen botanischen Garten *Pestalozzia Palmarum* Cooke, wobei auch er die Frage, ob der Pilz als Parasit oder Saprophyt zu betrachten sei, unentschieden läßt. In L. Rabenhorsts Kryptogamenflora finden sich nur zwei Pilze auf *Mesembrianthemum*-Spezies als Nährsubstrat erwähnt, nämlich *Comarosporium Mesembrianthemii* F. Tassi⁸⁾ und *Cladosporium herbarum* Pers.⁹⁾, ersteres als auf abgestorbenen Stengeln von *Mesembrianthemum deltoides* im botanischen Garten zu Siena in Italien beobachtet.

Daß *Sciara*larven in Blumentöpfen vorkommen, findet sich u. a. schon bei Meigen¹⁰⁾ angegeben. Derselbe beschreibt, biologische Daten gibt er im übrigen nur sehr wenige, ausführlich das Ausschlüpfen von *Sciara hyalipennis* aus der halb in der Erde steckenbleibenden Nymphenhaut.

Auch in unserm Fall handelt es sich um ein solches Auftreten der Larven in Topfkulturen. Die *Mesembrianthemum*-Sämlinge, im Frühjahr

¹⁾ Sorauer, P., Handb. d. Pflanzenkrankh. III. 1911. p. 459.

²⁾ Hollrung, M., Jahresber. üb. d. Neuer. u. Leist. a. d. Geb. d. Pflanzenkrankh. VI. 1905. p. 278, No. 1833 der Literaturübersicht.

³⁾ Klebahn, In England im Jahre 1892 beobachtete Krankheiten, nach Notizen aus Gardeners Chronicle. XII. 1892. p. 474. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. III. 1893. p. 210.)

⁴⁾ Nach Dr. Martin Schwartz (Flugbl. 51 [1912] der Kais. Biol. Anst. f. Land- u. Forstwirtschaft. p. 4) lebt eine Zwischenform der wirtswechselnden Pfirsichblattlaus (*Rhopalosiphum persicae* Pass. = *dianthi* Schr.) u. a. auch auf *Mesembrianthemum*.

⁵⁾ Matzdorff, In Belgien beobachtete Pflanzenkrankh., nach P. Nypels, Notes pathologiques. (Bull. Soc. roy. Bot. Belg. XXXVI. p. 183—275; Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 1899. IX. p. 164.)

⁶⁾ Mc. Alpine, D., Australian Fungi, New or unrecorded. Dec. V.—VI. (Proceed. of the Linn. Soc. of New South Wales. III. 1903. p. 553—563; Ref. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. XV. 1905. p. 174.)

⁷⁾ Leininger, H., Zur Morphologie und Physiologie der Fortpflanzung von *Pestalozzia Palmarum* Cooke. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 29. 1911. p. 5.)

⁸⁾ Allescher, A., Fungi imperfecti. (Rabenhorst. I. l. c. Abt. VII. 1903. p. 938.)

⁹⁾ Lindau, G., Fungi imperfecti. (Rabenhorst. I. l. c. Abt. VIII. 1907. p. 802.)

¹⁰⁾ Meigen, J. W., l. c. I. p. 223.

d. Js. gesät, hatten sich in erfreulicher Weise entwickelt, schon glaubte man hoffen zu dürfen, im Herbst die erste Häutung der merkwürdigen Pflänzchen zu beobachten, da zeigte sich, erst an einem, dann bald an mehreren, schließlich an allen, eine merkwürdige Verwundung. Von oben betrachtet, schienen die winzigen Keimblattpaar-Kreisel mit dem transversalen Querspalt auf der, im Gegensatz zu älteren Entwicklungszuständen der Art, frischgrünen Kreiseloberfläche, völlig intakt. Lediglich eine teilweise Verfärbung ins gelbliche erregte Bedenken. Da ergab eine nähere Beobachtung, daß seitwärts von unten her die Pflanzenkreisel an- und ausgefressen waren. Die ganze Art der Verwundung, vor allem die pralle Gesundheit des Gewebes des Rests der Pflänzchen bis zum letzten Augenblick, ließ den Gedanken einer etwaigen Bakteriose oder Pilzerkrankung gar nicht erst aufkommen. So nahe die Auffassung an sich lag, die später gefundenen *Sciara* larven müßten als primäre Krankheitserreger auch hier auszuschließen sein, ein Beweis hierfür konnte, mangels Auffindens irgendwelcher anderen Krankheitsursache, nicht erbracht werden. Wie, im übrigen zunächst frische, gesunde, angebissene Birnfrüchtchen steckten die Keimlinge in der Erde.

Ein Ausheben der Pflänzchen und Durchsuchen der Erde auf tierische Schädiger verlief zunächst resultatlos. Da die Schadenwirkung nichtsdestoweniger zunahm, wurde die betreffende Erde nochmals des Morgens untersucht, und der Aufmerksamkeit meiner Frau verdanke ich die schließliche Auffindung der Übeltäter, welche dann noch öfters auf frischer Tat unter den Pflänzchen in Gruppen bzw. Knäueln zusammensitzend, ertappt wurden. Die Schutzfärbung der glasartig glänzenden, walzenförmigen Tierchen mit dem pechschwarzen Kopf und dem dunkel durchschimmernden Inhalt des Darmtrakts ist, inmitten eines humosen, von Quarzsandkörnchen durchsetzten Bodens, verblüffend und erklärt, daß sich der Schädiger solange den Blicken entzog. Dazu kommt, daß infolge Klebrigkeit des Leibes allermeist Erdpartikelchen demselben anhaften, und daß das Tier, sobald Gefahr im Verzuge ist, sich sofort totstellt. Sämtliche Keimlinge fielen dem Schädling, der wahrscheinlich mit der verwendeten Blumenerde eingeschleppt wurde, binnen weniger Wochen zum Opfer. Seine Vernichtungsarbeit vollführt er vorzugsweise des Nachts.

Denn Sonnenlicht und Trockenheit können *Sciara* maden, wie man durch Anstellung einfacher Experimente jederzeit wieder von neuem beobachten kann, nicht vertragen. Auch Del Guercio hebt (l. c.) die diesbezügliche Empfindlichkeit der *Sciara* larven hervor, welche, der Sonne ausgesetzt, bald ihr Bewegungsvermögen verlieren und eingehen. Dasselbe kann man m. E. auch von dem Einfluß der Trockenheit sagen¹⁾. Im Wasser sollen demgegenüber *Sciara* larven bis 20 Stunden auszuhalten vermögen, ohne zu sterben. Es erscheint nach dem Gesagten nicht ausgeschlossen, daß u. a. auch zu große Trockenheit bzw. übergroße Nässe jene Massenwanderungen der Heerwurmmaden, von denen eingangs die Rede war, mitbedingen. Jedenfalls ist aus diesem biologischen Verhalten erklärlich, daß gerade in Pilzkulturen die größten *Sciara* schäden bisher zu verzeichnen gewesen sind.

Die Larven in unserem Falle waren wurmförmig gestaltet, hinten einfach zugespitzt, im übrigen stielrund, gelblichweiß durchscheinend, glänzend

¹⁾ Vgl. Dams, E., *Sciara* (giraudi aff.), ein Schädling junger Kakteenkulturen. (l. c. XIII. p. 21: „Von hoher Empfindlichkeit gegen Trockenheit. — Zimmerluft tötet sie in wenigen Minuten.“)

und oberflächlich von klebriger Beschaffenheit. Im Durchschnitt konnte man 15 Leibessegmente zählen. Die Körperlänge betrug etwa $\frac{1}{2}$ cm, die Dicke $\frac{1}{2}$ mm. An dem kleinen, glänzenschwarzen, zurückziehbaren Kopf waren unter dem Binokular deutlich zwei Kauzangen, in stetiger von außen nach innen erfolgender Bewegung begriffen, erkennbar. Durch mancherlei Querfalten innerhalb der Segmente erschien die Gliederung des Körpers etwas verwischt. Deutlich schimmerte der Darmtraktus, von inliegenden Kotmassen braunschwarz gefärbt und im hinteren Leibesdrittel oft in einer Schlinge verlaufend, durch die gelblichweiße, durchscheinende Haut. Extremitäten fehlten.

Mit den Larven angestellte Zuchtversuche ergaben nun im Laufe des Oktober eine Menge dunkelgefärbter, 2 mm langer, zierlicher Mücken, welche in ihrem raschen, ruckweisen Lauf und plötzlichem Auf- und Davonfliegen biologisch an die Cicindeliden unter den Laufkäfern erinnerten. In der Ruhelage fanden sich die perlmuttschimmernden, mikroskopisch fein behaarten Flügel parallel dem Körper aufgelegt.



Fig. 1. Larve von *Sciara nitidicollis* Meg. (*Sciara frigida* Wtz.?), stark vergr. — Phot. Dr. Ernst Reichenbach, Breslau.



Fig. 2. Imago (♂) von *Sciara nitidicollis* Meg. (*Sciara frigida* Wtz.?), stark vergrößert. — Phot. Dr. Ernst Reichenbach, Breslau.

Gerade der Nervenverlauf der Flügel nun ist bei der Gattung *Sciara*, wie schon Meigen (l. c. p. XII.) hervorhebt, „so ausschließlich eigen beschaffen, daß danach einzig und allein die Gattung von allen andern bestimmt und beständig zu unterscheiden ist.“ In der Tat genügte ein Vergleich mit Meigen's Tab. 4 „*Molobrus* Latr.“ Fig. 3, um auch in unserm Fall die Gattung sicher zu bestimmen. Die zwei vorderen und zwei hinteren Längsadern waren nebst der schleifenförmig nach dem Flügelende zu verlaufenden Gabelader, die vor allem charakteristisch ist, unverkennbar zu identifizieren. Auch die 16-Gliedrigkeit der schlanken Fühler mit verdicktem Paar erster Grundglieder, die, von vorn betrachtet, bohnenförmig ausgebuchteten Netzaugen, das Dreieck ungleich großer Punktaugen, die Dreigliedrigkeit der Taster, das zweigliedrige Paar von Hinterleibsanhängseln bei männlichen Individuen, all diese von Meigen angeführten Hauptmerkmale der *Sciaren* waren zweifellos wiederzufinden. Die Bestimmung der Art führte auf *Sciara nitidicollis* Meg., wie in der Überschrift dieses Aufsatzes angegeben.

Anbei die Meigensche Diagnose (l. c. p. 219): „Fühler braun, mit schwarzer Wurzel, etwa halb so lang als der Leib. Mittelleib und Schildchen glänzend schwarz; Hinterleib matter. Schwinger braun. Beine honiggelb mit braunen Füßen. Flügel etwas graulich, mit braunen Nerven: Randnerven schwärzlich; Gabelnerv mit blassem Stiele. — Sehr gemein. — 1 Lin.“ — Also etwa den dritten Teil der Größe einer Stechmücke (*Culex pipiens* L.)!

Gelegentlich der Betrachtung des Geschlechtsdimorphismus, der sich beim Weibchen nach Meigen (l. c. p. 217) durch einfaches Zugespitztsein des Hinterleibs zum Ausdruck bringt, gelang es, unter dem Mikroskop bzw. Binokular die häufchenweis erfolgende Ablage der Eier zu beobachten. Letztere sind winzig klein, hellzitronengelb und ohne Struktur oberflächlich glatt, von Gestalt eirund. Im übrigen scheinen auch mir die bald nach dem Ausschlüpfen in copula anzutreffenden Imagines recht kurzlebig zu sein.

Über die Biologie derselben ist, von der schon eingangs mitgeteilten Tatsache ihres ephemeren Imagodaseins auch bei *Sciara militaris* Now. abgesehen, im einzelnen noch sehr wenig bekannt. Umso interessanter ist folgende, neuere Beobachtung R. Stägers, Bern¹). Er stellte ein Massenerscheinen von Trauermücken (*Sciara Thomae* L.)²) auf von *Sphacelia segetum* (*Claviceps purpurea* Tul.) befallenen Roggenähren, ferner auch auf anderen, von *Claviceps* infizierten Gramineen, *Glyceria fluitans*, *Anthoxanthum odoratum* und *Deschampsia flexuosa*, fest. Demnach würde sich die vorliegende Art, von deren Menge „die betreffenden Ähren ganz schwarz erschienen und sich dem Beobachter schon von weitem als infiziert verrieten“, als Imago von Honigsäften nähren, u. a. auch, nach gleichfalls von Stäger gemachten Beobachtungen, von dem durch Blattläuse ausgeschiedenen „Honigtau“. Als Überträger der Mutterkornpilz-Konidien spielen *Sciara*-mücken auf jeden Fall eine nicht unbedeutende Rolle³). Weitere biologische Daten finden sich in der Literatur nur noch sehr wenige.

Judeich-Nitsche (l. c. II. p. 1127) erwähnt das häufige Vorkommen von *Sciara Thomae* L. auf Umbelliferenblüten zur Sommerszeit. Nach den dortigen Angaben (p. 1128) sollen ferner *Sciara*-arten zu den häufigsten Insekteneinschlüssen des Bernsteins gehören. Von besonderem Interesse ist Anton Kerner von Marilauns Angabe (Pflanzenleben. II. 1898. p. 148), nach der *Sciara*-mücken in den sog. Kesselfallblumen von *Arum italicum* beobachtet worden sind.

Von natürlichen Feinden der *Sciara*-larven gibt Ritzema Bos⁴) mit hohem Grad der Wahrscheinlichkeit Staphyliniden an, „größtenteils zu den Arten *Philonthus longicornis* Steph. (= *Scybalarius* Nordm.) und *Homalota euriptera* Steph. (= *validicornis*

¹) Stäger, R., Neue Beobachtungen über das Mutterkorn. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 27. 1910. p. 71/72.)

²) Der Hinweis auf den „Heerwurm“ (l. c. p. 71) läßt freilich die Frage offen, ob nicht vielmehr *Sciara militaris* Now. gemeint ist.

³) Vgl. auch Mercier, Sur le rôle des insectes comme agents de propagation de l'Ergot des Graminées. (Compt. Rend. Soc. Biolog. Paris. T. 80. 1911. p. 300—302; Ref. in Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 33. 1912. p. 505.) — Mercier fand danach im Verdauungstraktus u. a. von *Sciara Thomae* keimfähige Mutterkornkonidien von *Lolium perenne*.

⁴) Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. IV. 1894. p. 221/222.

Maerck.), ausnahmsweise zur Art *Philontus discoideus* Grav. gehörig.“ Daß ihr Nutzen sich, weil sie ja, um der *Sciara* larven habhaft zu werden, selbst Gänge in die Champignons zu fressen unter Umständen genötigt sind, trotz allem praktisch ins Gegenteil verwandeln kann, wird jedoch auch am angeführten Ort sogleich betont. Von kranken Heerwurmmaden, aber auch von gesunden Puppenzuständen der *Sciara militaris* Now. soll sich die Fliegenmade *Cyrtoneura pabulorum* nach verschiedentlichen Angaben¹⁾ nähren und so zur Verminderung des Heerwurms beitragen²⁾. Die Spezies ist mit unserm sog. Brummer (*Musca vomitoria* L., Schweißfliege, blaue Fleischfliege) verwandt.

Wenn also, nach dem Gesagten, die natürlichen Feinde der *Sciara* larven praktisch als Verbündete im Kampf gegen dieselben nicht in Betracht kommen können, so fragt es sich, gibt es überhaupt Bekämpfungsmaßnahmen, um sich der Schädiger zu erwehren. Namentlich gegen die Pilzvernichter unter ihnen hat man schon recht viele Mittel versucht, und wie so oft, so auch hier nur wenige als wirksam befunden. So hat 1893 Julien Costantin³⁾ durch Desinfektion der Gruben, Kästen und Mistbeete mit 2½-proz. Lysolwasser Eier und Maden der Pilzmücke (*Sciara ingenua*) vernichtet und damit das Madigwerden der Champignons behoben. Nach neueren Beobachtungen soll sich aber der Lysolgeruch aus solchen behandelten Örtlichkeiten schwer entfernen lassen⁴⁾. Hiltner empfiehlt unter solchen Umständen Auswaschung mit Sodalösung, Kalken der Wände bzw. wiederholte Formalinräucherung. Als Insekticide schlägt er Spritzungen mit Dufourscher Lösung, Verstäuben von Insektenpulver als erfolgverheißend vor, desgleichen Desinfektion der Komposthaufen durch in Löcher eingegossenen Schwefelkohlenstoff. Auch Vernichtungsversuche mit Schwefligsäureanhydrid sind angestellt worden⁵⁾. Nach Reh (l. c. p. 459) hilft Streuen von Tabak oder Kalk etwas gegen die Larven, desgleichen ein Erhitzen des Düngers auf 45–50° C, sowie Verwendung möglichst von verrottetem Dünger statt von frischem.

Die Mücken selbst sollen sich nach demselben Autor durch Räuchern mit Tabak und Schwefel vertreiben, bzw. töten lassen. Ritzema Bosrät (l. c. p. 221), eventuell mit Honig bestrichene Bretter oder Stöcke in den Höhlen, welche zur Champignonzucht dienen, anzubringen, damit die kleinen Insekten sich darauf setzen und festkleben, verspricht sich aber selbst auch nicht allzuviel von dieser Maßnahme.

Als sehr vorteilhafte Vorbeugungsmaßregel empfiehlt schließlich G. Delacroix⁶⁾ die Verwendung künstlich gezüchteten Champignonmycels, um eine Einschleppung der Larvenbrut und all der anderen, die Kultur dieser Pilze bedrohenden Krankheitskeime zu vermeiden.

Ratschläge prophylaktischer wie therapeutischer Art, soweit Topfkulturen pflanzlicher Sämlinge als gefährdet in Betracht kommen, gibt Erich Dams in seiner oben zitierten Arbeit. Auch er ist, auf Grund seiner Erfahrungen, von der unmittelbaren Schädlichkeit der *Sciara* larven für ein- und

¹⁾ Brehms Tierleben. 3. Aufl. IX. 1892. p. 484.

²⁾ Hollrungs Jahresber. üb. Pflanzenkrankh. X. 1909. p. 48.

³⁾ Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. III. 1893. p. 246, auch XIII. 1903. p. 235.

⁴⁾ Prakt. Blätt. f. Pflanzenb. u. Pflanzensch. III. 1905. p. 10.

⁵⁾ Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. II. 1892. p. 366.

⁶⁾ Delacroix, G., Rapport sur les traitements à appliquer aux maladies, qui attaquent le champignon de couche dans les environs de Paris. (Bull. du Minist. d'Agricult. 1900. No. 5; Ref. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. XIII. 1903. p. 235.)

zweijährige Kakteensämlinge, namentlich während der Wintermonate, überzeugt. Auf ungenaue Beobachtung führt D a m s jede etwaige Umkehrung des Kausalzusammenhangs zurück, wonach Fäulniserreger die primäre Ursache, Sciara larven lediglich sekundäre Begleiterscheinungen darstellen sollten. Wir können uns der D a m s schen Ansicht hier um so mehr anschließen, als das für Kakteen gegebene Krankheitsbild — Anfressen der Pflänzchen am Wurzelhals, Aushöhlen derselben — das gleiche ist als das unsererseits bei *Mesembrianthemum pseudotruncatellum* Berger beobachtete.

Als Vorbeugungsmaßnahme rät nun D a m s, im Gegensatz zu früheren Gewährsmännern (l. c. Jg. 1894. p. 45 u. anderwärts), Wegfangen bereits der Mücken selbst, sei es mittels zahlreich zwischen den Sämlingen eingesteckter, kurzer Fliegenruten, sei es durch Bestreichen der Unterseite der die Kulturen bedeckenden Glasplatte mit Fliegenleim. Da humusreiche Laub-erde dem Schädling am meisten zusagt, schlägt D a m s einen Zusatz von Lehm zu der Erdmischung vor ($\frac{1}{3}$ und mehr). Ich möchte, daran anschließend, raten, speziell humose Erde vor Gebrauch auf das Vorhandensein der Larven genau zu untersuchen. Nach B u c h h e i m (Monatsschr. f. Kakteenkunde. 1894. p. 45) soll Begießen der betr. Töpfe mit 30° C warmem Wasser die Larven an die Erdoberfläche treiben, wo sie dann sorgfältig abzulesen wären. Wenn D a m s gerade diese Maßnahme als den Pflanzen nicht zusagend verwirft, so dürfte sie trotzdem, in unserm Sinne zur Vorbeuge angewandt, Beachtung verdienen.

Bei der Bekämpfung der Larven als solche empfiehlt D a m s, die angefressenen Pflanzen vorsichtig mit Wurzeln und Erdballen mitsamt den Schädigern auszuheben und zu verbrennen, unter Absuchung auch der näheren Umgebung der Stellen, wo die Erkrankten gestanden. „Um ganz sicher zu gehen“, schreibt er dann, am angeführten Orte Seite 21 weiter, „kann man den Oberteil des Sämlings mit der angenagten, gereinigten Fläche auf die Erde legen und als Fangapparat benutzen, unter dem sich oft in den nächsten Tagen zurückgebliebene Schädlinge ansammeln.“ Ich möchte, auf Grund meiner Beobachtungen an *Mesembrianthemum pseudotruncatellum* Berger, speziell auf dieses Köderverfahren, das mit Hilfe bereits angefressener Individuen als Fangpflanzen auszuführen wäre, noch mit besonderem Nachdruck hinweisen. Angestellte Versuche ergaben, daß sich allmorgentlich immer von neuem Sciara larven unter solchen Köderstückchen angesammelt vorfanden.

Eine absolut genaue Artbestimmung ist, wie schon Meigen (l. c. I, p. 217) hervorhebt, sehr schwer. Wenn ich die vorliegende Art trotzdem als *Sciara nitidicollis* Meg. bezeichne, so rührt das daher, daß ich unter den Meigenschen Diagnosen der Spezies keine fand, die, soweit die dortigen diagnostischen Angaben reichten, besser paßte. — Während der Drucklegung obigen Manuskripts hatte der z. Zt. beste Sciaridenkenner, Herr Ew. H. Rübsaamen-Coblenz, die große Liebenswürdigkeit, die vorliegende Spezies auf Grund ihm übersandten Materials von Puppen und Imagostadien an der Hand der Winnertzschen Arbeiten (1868) als *Sciara frigida* Wtz. (= *viridula* = *velox* Wtz.?) gütigst zu bestimmen. *Sciara nitidicollis* Meg. erwähnt Winnertz nach Ew. H. Rübsaamen überhaupt nicht, und umgekehrt Meigen nicht *Sciara frigida*. Nach Herrn Rübsaamens

freundlichst zur Verfügung gestellten Mitteilungen (Briefe vom 1. und 8. November 1912) „ist es zur Zeit kaum möglich, mit Sicherheit europäische Sciariden zu bestimmen, da die von Winnertz als konstant betrachteten Merkmale dies nicht immer sind und Winnertz in seiner Monographie allein 234 Arten beschreibt.“ Auch die von Winnertz für *Sciara frigida* gegebene Beschreibung paßte nach Rübsaamen nicht ganz auf die vorliegende Art (Brief vom 1. November 1912), „doch handelte es sich hierbei offenbar um nicht konstante Merkmale, die auch bei den übersandten Tieren variierten.“ „Mit *Sciara frigida* Wtz. hat *Sciara nitidicollis* Meig. (nach Schiner, 1864) gemein, daß die Unterrandader vor der Gabelwurzel in den Vorderrand mündet und daß die Schwinger braun sind und einen hellen Stiel haben.“ Herr Ew. H. Rübsaamen beabsichtigt, nach Beendigung seines großen Gallenwerkes, die Winnertz'sche Sammlung, die sich wohl erhalten in Bonn befindet, gründlich durchzuarbeiten und so den Sciariden, den „Stiefkindern des Entomologen“, zu ihrem Rechte zu verhelfen. (Mitteilung vom 8. November 1912.) Für seine gütige Hilfeleistung in vorliegendem Falle sage ich Herrn Rübsaamen auch an dieser Stelle nochmals verbindlichen Dank!

Nachdruck verboten.

Notiz über Eierkonservierung in China.

Von Jun Hanzawa, z. Z. Paris.

In China ist die Produktion von Eiern, besonders von Enteneiern, derart groß, daß man auf eine Konservierung derselben angewiesen ist, damit man zunächst auch Roheier in einer Zeit, in welcher es wenig frische Eier gibt, zur Verfügung hat. Die konservierten Eier werden in China sehr gern gegessen, hauptsächlich als Nachspeise.

Die chinesische Methode der Eikonseervierung ist etwas anders als unsere Methoden, insbesondere gibt es in der Provinz Tschekiang (Kasching fu) und Provinz Kiangssu (Ssongkong fu und Ssutseu fu) 3 verschiedene Arten, die „Pidan“, „Hueidan“ und „Dsaudan“ benannt werden.¹⁾ Man verfährt wie folgt¹⁾:

Pidan: Die frischen Eier bedeckt man ca. 1 cm dick mit einem Gemenge von roter Erde, Kalk, Kochsalz und Wasser, und vermeidet durch Zusatz von Reishülsen das Ersticken der Eier. Die mit Erde bedeckten Eier (ca. 100 Stück) legt man in einen Topf, dessen Deckel mit Papier luftdicht verklebt wird. Nach 5—6 Monaten sind die Eier in dem von den Konsumenten verlangten Zustande. Das Eiweiß wird dabei koaguliert, hat durchsichtige, gelatineähnliche Konsistenz und braune Farbe, das Eigelb wird dickbreiartig und schwarzgrün. In dem koagulierten Eiweiß kommen vereinzelt tyrosinähnliche Kristalle vor, man nennt sie dort „Sunghua-Pidan“ (Sunghua bedeutet Kiefernadel). Man genießt sie mit oder ohne Soja und Zucker.

Hueidan: In den Topf bringt man ein Gemenge von roter Erde, Kochsalz und Wasser, in das die frischen Eier eingelegt werden. Nach 20 Tagen erreicht das Ei eßbare Beschaffenheit, wobei das Eigelb gelbrot wird. Gekocht ißt man sie mit Soja und Zucker.

¹⁾ Mita, S., Bokuchiku Zasshi. 1908. No. 273—276.

D s a u d a n: Die Eier werden in einen Topf mit Preßkuchen eingelegt, man genießt sie erst nach 5—6 Monaten.

Nach diesem verschiedenen Verfahren behandelt, verändern die Eier also Konsistenz und Farbe. Beim **P i d a n** wird, wie schon oben gesagt, das Eiweiß koaguliert und braun, das Eigelb dick breiartig und schwarzgrün. Über die Ursachen dieser Umwandlung fehlen meines Wissens wissenschaftliche Erklärungen, aber man glaubt, daß das Salz von außen nach innen eindringt und die Veränderungen verursacht. Das Eiweiß wird bekanntlich leicht durch viele Chemikalien koaguliert, ähnlich durch Mikroorganismen; auch die Farbe wird dabei verändert. Ich habe noch keine chemische Analyse gemacht, um etwaige chemische Veränderungen festzustellen. Die schwarzgrüne Farbe des veränderten Dotters verschwindet an der Luft nach einigen Tagen ganz; — das Eigelb gewinnt seine natürliche Färbung wieder. Der Geruch ist schwefelwasserstoffartig, aber Bleiazetat bleibt dabei farblos und auch Indol ist nicht nachgewiesen.

Nach vorsichtigem Putzen, Waschen und Sterilisieren der Schale legte ich das herausgenommene Eiweiß und Eigelb in eine sterilisierte Petri-Schale, worauf sich nach einigen Tagen einige Bakterienkolonien (5 Arten¹⁾ von Bakterien) an der Oberfläche entwickelten. Ich versuchte auch, frische Eier mit den konservierten anzustecken. Ich habe nach der Infektion mit **Pidan** das Versuchs-Ei mit Wasserglas bestrichen und in Watte verpackt. Nach einigen Monaten war das infizierte Ei koaguliert und verfärbt, genau wie das originale Ei, das zur Kontrolle eingelegte Ei dagegen faulte.

Ich habe die isolierten Bakterien noch nicht weiter untersucht, doch glaube ich, daß Koagulation wie Verfärbung des **Pidan** bakteriellen Ursprungs sind.

Hannover, August 1912.

Nachdruck verboten.

Methode zur Schätzung der Anzahl von Protozoën im Boden.

Von **Otto Rahn**,

University of Illinois, Urbana, Ill.

Die hier beschriebene Methode zum Zählen der Protozoën im Boden macht weder auf Genauigkeit noch auf Originalität Anspruch. Ich habe sie bereits seit zwei Jahren benutzt und als regelmäßigen Laboratoriumsversuch im bodenbakteriologischen Praktikum eingeführt. Da ich jedoch von Herrn Direktor **Russell** in **Rothamstedt** erfuhr, daß man dort an diese recht einfache Abschätzungsmethode noch nicht gedacht hat, will ich dieselbe kurz beschreiben.

Das Prinzip ist die Verdünnungsmethode, die vor Einführung der Gelatine zum Zählen von Bakterien benutzt wurde, und die von **Hiltner** und **Störmer** zum Zählen bestimmter Bodenorganismen empfohlen ist. Man macht Verdünnungen des Bodens in der üblichen Weise (ich habe auf Pipetten mit weiter Öffnung großen Wert gelegt) und überträgt je 1 ccm derselben in sterile Bouillon, Pepton- oder Zuckerlösung. Die mit dem Boden übertragenen Bakterien werden sich schnell vermehren, und daher ist in diesen

¹⁾ Die Bakterienarten sind folgende: 2 **Sarcina**, 2 **Micrococcus** und ein **Bacillus** (begeißelt), alle wachsen sehr langsam auf den Nährböden.

Verdünnungen reichliche Nahrung für bakterienfressende Protozoën vorhanden. Wenn also die Verdünnung 1 : 100 derartige Protozoën enthält, so werden sich dieselben vermehren können, und nach 7—14 Tagen sind sie in solcher Zahl vorhanden, daß eine mikroskopische Untersuchung der betreffenden Nährlösung ihre Gegenwart leicht erkennen läßt. Zeigt die mit $\frac{1}{1000}$ ccm geimpfte Lösung keine Protozoën, so ist angenommen worden, daß die Anzahl der Protozoën in der betreffenden Erde zwischen 100 und 1000 per Gramm beträgt.

Diese Annahme ist nicht ohne weiteres richtig. Man muß nämlich den Einfluß der bakteriellen Stoffwechselprodukte auf die Protozoën in Betracht ziehen. In Zuckerlösungen wird regelmäßig Säure gebildet, in Peptonlösungen dagegen Ammoniak, und die Vermutung, daß dies die Protozoën erheblich beeinflussen kann, liegt auf der Hand. Es war auch leicht, diesen Einfluß experimentell nachzuweisen. Herr A. Itano machte auf meine Veranlassung im Herbst 1910 einen Versuch über das Verhalten der Protozoën in trocknender Erde.

Alte „verbrauchte“ Gewächshauserde wurde gesiebt und in zwei Proben geteilt, deren eine dauernd feucht gehalten wurde, während die andere in dünner Schicht schnell trocknete. Nach 2, 3, 7, 14 und 15 Tagen wurden von beiden Proben Verdünnungen angelegt und in Röhren mit steriler Pepton- bzw. Zuckerlösung übertragen. Etwa 10 Tage nach der Impfung wurde jedes Röhren mikroskopisch auf die Gegenwart von Protozoën geprüft. Es wurden drei verschiedene Typen von Protozoën unterschieden, Amöben (A), große Ciliaten (B) und kleine Flagellaten (C). Die Resultate ergibt die folgende Tabelle:

Zuckerlösung.

	Verdünnung	nach 2 Tagen			nach 3 Tagen			nach 7 Tagen			nach 14 Tagen			nach 15 Tagen		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
feucht	1 : 10	0	+	++	+	+	++	+	+	++	0	+	++	+	+	++
	1 : 100	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+
	1 : 1000	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+
	1 : 10 000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
trocken	1 : 10	0	+	+	0	+	+	0	+	++	0	0	0	0	0	0
	1 : 100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 : 1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 : 10 000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Peptonlösung.

feucht	1 : 10	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+
	1 : 100	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+
	1 : 1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
	1 : 10 000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
trocken	1 : 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 : 100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 : 1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1 : 10 000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die Anzahl der Protozoën in der feucht gehaltenen Erde annähernd konstant bleibt, während sie in der trockenen Erde abnimmt. Die Erde enthält nach den Ergebnissen in der Zuckerlösung etwa 10 Amöben per Gramm, manchmal mehr als 10, manchmal weniger.

Aus den Daten der Peptonlösung ergibt sich aber, daß die Anzahl der Amöben etwa 100 war, d. h. die Zuckerlösung, oder die darin von den Bakterien gebildeten Stoffe sind für das Amöbenwachstum nicht günstig. Das Gegenteil ist bei den andern Protozoen der Fall. Wir finden als Höchstwerte zwischen 1000 und 10 000 kleine Flagellaten und etwa 100 große Ziliaten, und zwar ist die Entwicklung in der Zuckerlösung erheblich besser als in der Peptonlösung.

Beim Trocknen des Bodens verschwinden zuerst die Amöben, nach 7tägigem Trocknen sind aber auch die andern Protozoen verschwunden, d. h. ihre Zahl ist kleiner als 10 per Gramm.

Der Versuch zeigt, daß diese Methode nur bei der Wahl eines richtigen Nährbodens richtige Werte liefern wird, und daß verschiedene Protozoen verschiedene Nährböden vorziehen. Die bisher erhaltenen Resultate dürfen daher nur als Minimalwerte angesehen werden. Es soll nur beiläufig erwähnt werden, daß ein Protozoon von der 10-fachen Länge eines Bacteriums das 1000-fache Körpervolumen hat, daß also 1000 Protozoen per Gramm Boden annähernd dasselbe Lebendgewicht haben wie 1 000 000 Bakterien.

Die systematische Prüfung und weitere Ausarbeitung der Methode muß ich andern überlassen, da ich wegen Fortgangs von der Versuchsstation East Lansing vorläufig nicht mehr bodenbakteriologisch arbeiten werde.

Nachdruck verboten.

Über die Methoden zur Gewinnung mikroorganismenfreier Samen.

I. Aseptische Gewinnung reiner Samen.

[Aus dem Botan. Laborat. des Alexeischen Donschen Polytechnischen Instituts zu Nowotscherkassk N 21.]

Von Prof. V. Arcichovskij.

Die Wichtigkeit der Ausführung physiologischer Experimente an höheren Pflanzen unter den Bedingungen der Reinkultur bedarf keines Beweises. Freilich fehlt eine entsprechende genügende Methodik jetzt noch. Das erste Hindernis, auf das der Versuchsansteller dabei stößt, ist die Schwierigkeit, mikroorganismenfreie Samen zu erhalten. Desinfektion der Samen mit verschiedenen Giften führt nicht immer zum gewünschten Ziele. Die meisten Autoren, die mit dieser Methode arbeiteten, besonders diejenigen, die als Desinfektionsmittel Sublimat benutzten, klagten, daß ihre Kulturen sich am Ende doch verunreinigt erwiesen. In den Fällen, wo bei den Experimenten mit desinfizierten Samen keine Verunreinigung eingetreten war, dürfte der Grund hierfür, wie öfters angegeben (vgl. R. de Zeeuw, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. p. 4), eine wenig sorgfältige Samendurchwaschung nach der Desinfektion gewesen sein. Die Reste des desinfizierenden Stoffes können dabei die Entwicklung der noch am Leben gebliebenen Keime von Mikroorganismen zerstören.

Als ich im Jahre 1910 an das eingehende Studium der verschiedenen Methoden zur Erhaltung reiner Samen heranging, überzeugte ich mich durch eigene Erfahrung, daß die Desinfektion der Samen durch die verschiedenen Giftstoffe nicht genügend gesichert ist.

Wenn es auch möglich ist, reine Samen und reine Kulturen höherer Gewächse mit Desinfektionsmitteln zu erhalten¹⁾, so stellt doch in jedem Falle die Bearbeitung der Samen durch kräftige Gifte, wozu noch die Schwierigkeit der Entfernung der letzten Spuren des desinfizierenden Stoffes kommt, eine äußerst unerwünschte Verwicklung der ferneren physiologischen Versuche dar.

Besonderen Wert muß man deshalb auf die Methode der aseptischen Gewinnung reiner Samen legen. Daß die Samen in einer gesunden Frucht frei von Mikroorganismen sein müssen, erscheint ziemlich sicher, jedoch muß erst die Untersuchung ergeben, ob diese Annahme auch in Wirklichkeit richtig ist. Vorläufig erspare ich mir die Mitteilung meiner Resultate in bezug auf die Reinigung der Samen durch mechanische Mittel und durch desinfizierende Stoffe und beschränke mich hier auf die weniger eingehende Wiedergabe der von mir bei der Anwendung der aseptischen Methode gefundenen Resultate²⁾:

Eine gesunde, unbeschädigte Frucht wurde vor allem einer äußeren Reinigung unterworfen, die durch verschiedene Verfahren ausgeführt wurde. Öfters wurden die Früchte über einen Gasbrenner in der Art gezogen, wie man Bakterien durch eine Flamme auf den Deckgläsern fixiert. In einer Reihe von Versuchen wurde auch die Desinfektion durch verschiedene Stoffe angewandt, nämlich

1. konzentrierte Schwefelsäure³⁾,
2. 3-proz. Lösung von Wasserstoffsuperoxyd,
3. 1-proz. Lösung von Sublimat,
4. 5-proz. Lösung von grüner Seife.

Die Erfahrung hat gelehrt, daß die verschiedenen Methoden der Desinfektion, oder überhaupt der Reinigung fleischiger Früchte fast gleiche Resultate ergaben. Bei trockenen Früchten aber liefert unzweifelhaft das Brennen die besten Resultate, nicht aber die Desinfektion durch Lösungen. Die gereinigte Frucht wurde in der Saatkamera („sterilen Kasten“) mit sterilen Instrumenten geöffnet und die Samen in gewöhnliche Nährbouillon gelegt, wobei sie entweder einzeln in apperten Probiergläsern lagen, oder auch viele gemeinschaftlich in einem mit Bouillon gefüllten Gefäße. Die Kölbchen und die Probiergläser mit den Samen wurden auf die Dauer von 14 Tagen (oft auch mehr) in einen Thermostaten bei einer Temperatur von 35° aufgestellt. Infolge einer Reise war ich leider gezwungen, die Versuche No. 11—14 nach 10 Tagen zu unterbrechen.

Wenn die Samen verunreinigt waren, so ergab sich die Entwicklung von Mikroorganismen in der Trübung der Bouillon oder in der Bildung eines Häutchens auf der Oberfläche derselben. In zweifelhaften Fällen jedoch mußte eine mikroskopische Untersuchung der Bouillon helfen, und es wurden außerdem die zweifelhaften Niederschläge oder die trübe Flüssigkeit auf Agar übertragen. Diejenigen Samen, die in der Bouillon keine Entwicklung von

¹⁾ Sch ulow, I w., Zur Methodik steriler Kulturen höherer Pflanzen. (Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellsch. Bd. 31. 1911. p. 504.)

²⁾ Ausführlicher werden diese Resultate in den Annalen der Samenprüfungsanstalt am Kais. Bot. Garten zu St. Petersburg veröffentlicht.

³⁾ Ohne jede weiteren Folgen ertrugen die Beeren von *Physalis Francheti* und unreife Kapseln von *Iris pumila* ein halbstündiges Bad in konzentrierter Schwefelsäure. Bei anderen Versuchen erwiesen sich auch die Samen äußerst widerstandsfähig gegen konzentrierte Schwefelsäure. (Hiltner, Arb. a. d. Biol. Abt. f. Land- u. Forstwirtsch. a. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. 3. 1903.)

No des Vor- suches	Name des Gewächses	Datum	Die Art der äußeren Desinfektion	Die Zahl der Früchte	Die Zahl der Samen	Die Zahl der Gefäße	Die Zahl der reinen Samen	Die Zahl der ver- unreinigten Samen
1	Kürbis (Cucurbita Pepo)	2 /I—5 /II 1911	Sublimat 1% 1%	1	60	1 Kolb	60	0
4	Physalis Francheti	15 /II—4 /III	"	1	59	Probierg. 50	58	1
5	Physalis Francheti	5 /III—19 /III	Konzentrierte H_2SO_4 , $\frac{1}{2}$ St.	1	24	Probierg. 23	24	0
9	Iris pumila	27 /VI—10 /VI	grüne Seife, 5%, 1 St.	1	59	Probierg. 1 Kolb	59	0
10	Iris pumila	27 /VI—10 /VII	grüne Seife 5% 1 St., dann nach der Waschung H_2SO_4 $\frac{1}{2}$ St.	1	20	1 Kolb	20	0
11	Iris pumila	30 /VI—10 /VII	H_2O_2 , 3%, 3 St. Flamme	5	24	1 Kolb	24	0
12	Erbse (Mautners)	30 /VI—10 /VII			20	5	20	0
13	Erbse "	30 /VI—10 /VII		2	7	Probierg. 2	7	0
29	Erbse " (unreife Samen)	26 /VI—10 /VII 1912	4 St in 3% H_2O_2 (die Früchte waren eingetaucht) Flamme	6	26	Probierg. 23	26	0
20	Phaseolus vulgaris	13—27 /IV	"	5	18	Probierg. 18	18	0
21	Phaseolus multiflorus	13—27 /IV	"	2	6	Probierg. 6	5	1
22	Capsella Bursa pastoris	29 /V—12 /VI	"	4	58	Probierg. 4	58	0
23	Capsella Bursa pastoris	31 /V—14 /VI	"	6	82	Probierg. 4	82	0
24	Thlaspi arvense	31 /V—14 /VI	"	4	17	Probierg. 4	17	0
27	Alyssum minimum	10 /VI—24 /VI	"	5	12	Probierg. 5	10	2 (in 1 Pro- bierringlasse)
28	Melandrium album	12 /VI—26 /VI	"	1	205	Probierg. 1	205	0
17	Zea Mays	30. /I.—13. /II.	"	1	16	Probierg. 16	16	0
17 bis	Zea Mays	30. /I.—13. /II.	"	1	20	Probierg. 1 Kolb.	—	Die Bouillon wurde den 13. Tag in d. Kolben Trübe
18	Zea Mays	12. /IV.—26 /IV	"	1	24	24 Probierg.	24	0
19	Zea Mays	13. /IV.—27. /IV	"	1	24	24 Probierg.	24	0

Mikroorganismen hervorriefen, bezeichne ich als „reine“ Samen. Die zur Probe gestellten Samen könnten wohl auch von solchen Mikroorganismen verunreinigt werden, die nicht imstande sind, in der Bouillon zu gedeihen. Aber die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung der Samen nur durch solche Mikroorganismen ist so gering, daß man fast ohne jeden Zweifel die Samen, die in der Bouillon eine Entwicklung von Mikroorganismen nicht hervorrufen, als wirklich rein bezeichnen kann.

Die Resultate der Versuche sind in vorhergehender Tabelle zusammengestellt.

Gewiß können nicht alle Samen aseptisch aus den Früchten rein erhalten werden. Insbesondere ist dieses bei den Körnern der Getreidearten unausführbar, die ja für sich allein einen eigenartigen Typus solcher Früchte darstellen, bei denen man die Samen nicht herausnehmen kann, weil die Schale dieser Samen, wie wohl bekannt, mit der Fruchtwand zu einer gemeinsamen Schale zusammengewachsen ist. Und doch werden die Körner der Getreidearten sehr häufig als Objekte für physiologische Versuche genommen. Es ist daher wichtig, sich Klarheit zu verschaffen, ob die eigentlichen Kornsamens aseptisch rein erhalten werden können oder nicht. Vom größten Interesse ist in dieser Hinsicht der Mais (*Zea Mays*), denn der Maiskolben ist von vielen enganeinanderliegenden Blättern der Scheide eingehüllt. Die Versuche zeigten, daß im ungeöffneten Maiskolben die Körner sehr lange rein bleiben, wie aus der Tabelle hervorgeht. Hier ist noch zu erwähnen, daß für diese Versuche solche Maiskolben genommen wurden, die ohne große Vorsicht, insbesondere ohne jeden Schutz gegen Staub, im Laboratorium seit August aufbewahrt wurden, während die eigentlichen Versuche erst vom Januar bis April vorgenommen worden waren. Die Gewinnung der Körner der Maiskolben wurde nach dem Brennen der Umhüllung vorgenommen, nachdem zuvor die hervorragenden Enden der haarartigen Narben mit der Flamme entfernt worden waren und jedes einzelne Blatt der Umhüllung sowie auch der kahl gewordene Maiskolben mit den Körnern über die Flamme gezogen worden war.

Es ist sehr wichtig, zu wissen, daß man die Körner in einem unaufgedeckten, gesunden Maiskolben als rein betrachten kann, da man dann zu jeder Zeit reine Samen vom Mais, und dabei auch in beträchtlicher Anzahl, zur Verfügung haben kann.

Was den Roggen mit seinen aus den Ähren hervorragenden Körnern anbetrifft, so ist hier eine Reinheit der Körner nicht zu erwarten, und in der Tat zeigten sich alle 24 Probierröhrchen mit Roggenkörnern, obwohl sie mit der üblichen Vorsicht aus der Ähre genommen waren, schon am zweiten Tage verunreinigt (Versuch No. 28a). Ein gleiches Resultat zeigten die Körner vom Weizen (Versuch No. 30 und 31).

Bald nachdem sich die Früchte (z. B. Kapseln) geöffnet haben, tritt in der Natur die Verunreinigung der Samen ziemlich rasch ein. In manchen Fällen kann man aber auch aus den geöffneten Früchten reine Samen erhalten. Zum Beispiel:

Versuch No. 23: Samen aus 5 geöffneten Kapseln von *Papaver Rhoeas* wurden in 5 Probierröhrchen geschüttet. In einem Probierröhrchen mit 435 Samen blieb die Bouillon nach 14 Tagen rein, die 4 übrigen waren verunreinigt.

Versuch No. 24: Samen aus 3 geöffneten Kapseln von *Melandrium album* wurden in 3 Probierröhrchen gelegt. In einem Probierröhrchen blieben 49 Samen ohne Verunreinigung.

Andererseits gaben die Samen aus zwar nicht geöffneten, aber mit schwarzen und braunen Flecken, Punkten usw. bedeckten Früchten (*Papaver somniferum* [Versuch No. 33], *Hyoscyamus niger*, [Versuch No. 34] u. a.) einen großen Prozentsatz von verunreinigten Samen.

Für die Gewinnung reiner Samen ungeeignet erwiesen sich auch die von Insekten beschädigten Früchte. Folgende Beobachtung verdient aber einer Erwähnung:

Versuch No. 27, 12.—26. VI. 1912. Zwei fast reife Kapseln von *Melandrium album* wurden nach der Entfernung des Kelches in den Exsikkator gestellt. Nachdem sich die Kapseln geöffnet hatten, wurde ihr Inhalt unter den gewöhnlichen Vorsichtsmaßregeln in die Probiergläser getan. Die erste Kapsel gab 205 Samen, welche sich alle als rein erwiesen; die zweite Kapsel enthielt hauptsächlich Exkremente der Insektlarven, die fast alle Samen schon gefressen hatten. Eine Larve fiel lebend in die Bouillon und starb. Zu meiner Verwunderung erwies sich die Leiche der Larve, sowie auch ihre Faecalia von Mikroorganismen frei. Augenscheinlich kann das Insekt, indem es die Fruchtknotenwand mit seinem Stachel durchsticht, diese Operation ganz aseptisch ausführen.

Es verdient andererseits einer Erwähnung, daß auch junge, unreife Samen, an denen die Reinigungsmethode mittels desinfizierender Stoffe kaum anwendbar ist, leicht aseptisch zu gewinnen sind. Bei der Erforschung des Reifeprozesses der Samen wird diese Methode von besonderem Werte sein.

Die Methode der aseptischen Gewinnung reiner Samen ist natürlich nicht unbedingt zuverlässig, denn auch eine äußerlich gesunde Frucht kann verunreinigte Samen in sich bergen, obgleich, wie aus diesen Versuchen erhellt, die Möglichkeit des Vorhandenseins solcher verunreinigten Samen in einer äußerlich gesunden Frucht sehr gering ist.

Mit Erbsen und Mais habe ich auch Versuche gemacht, um die äußere Sterilisation der Früchte (resp. Kolben) ganz zu umgehen; die Resultate zeigten aber, daß dabei ein ziemlich großer Prozentsatz der Samen verunreinigt war. Bei einem Versuche (No. 32) mit Erbsen waren ca. 62% verunreinigt, und bei Mais in einem Versuche (No. 152) 42% und im anderen (No. 153) 12,5%.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen kann man also annehmen, daß die Pflanzensamen in einer gesunden, unbeschädigten Frucht rein von Mikroorganismen sind. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, reine Samen von verschiedenen Gewächsen leicht und auch in beträchtlicher Anzahl für die physiologischen Forschungen zu erhalten. Zweckmäßiger ist es also, die Samen aseptisch zu gewinnen, denn man kann im anderen Falle die beim Sammeln usw. verunreinigten Samen nur mit großer Mühe von den Verunreinigungen befreien. Was im Vorhergehenden von den Samen gesagt wurde, gilt auch für die Körner des Mayses.

In den Laboratorien kann man dann die reinen Samen, selbstverständlich wenn sie rechtzeitig mit genügender Vorsicht gesammelt sind, und sogar die Früchte aufbewahren.

Eine neue Mikroskopierlampe.

Von Dr. Max Wolff, Bromberg-Schröttersdorf.

Abteilung für Pflanzenkrankheiten am Kaiser Wilhelms-Institut für Landwirtschaft.

Mit 2 Textfiguren.

In der Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie habe ich vor einem Jahre (vgl. Bd. 28. H. 3. p. 300—321) eingehend die besonderen und wichtigen Vorzüge erörtert, die eine neue automatisch regulierende Bogenlampe, die von Herrn Gustav Geiger-München konstruierte „Ewon-Lampe“, gegenüber allen anderen bisher für mikro- und makrophotographische Arbeiten verwandten Typen, nicht nur, wie selbstverständlich, gegenüber den Handregulierlampen, sondern auch gegenüber den bisher existierenden automatisch den Flammenbogen regulierenden Konstruktionen aufweist.

Die Geigerschen Lampen zeichnen sich aus dadurch, daß sie nur eine sehr geringe Stromstärke, nämlich nur $3\frac{1}{2}$ —4 Ampère, beanspruchen und dabei doch ein äußerst gleichmäßiges und ruhiges Licht geben, vor allem aber auch in idealer Weise die Fixpunktforderung erfüllen. Das letztere heißt: der Lichtbogen bleibt ständig an derselben Stelle und mithin, wenn die Lampe in einem geeigneten Gehäuse mit Kondensorsystem Aufstellung findet (wie es z. B. bei dem Geigerschen von mir l. c. näher beschriebenen Miniatur-Scheinwerfer und bei der neuen Mikroskopierlampe der Fall ist), ohne jede weitere Wartung während der ganzen, für eine kleinere Lampe ungewöhnlich langen ($3\frac{1}{2}$ Stunden) Brenndauer der (Siemensschen) Kohlen auf die optische Achse des beleuchtenden Linsensystems zentriert. Ich begreife nicht, daß Seitz nun auf seine neue Lampe ein lediglich generell die Fixpunktleistung schützendes Patent erhalten haben soll.

Die Ewon-Lampe ist bis heute die einzige Bogenlampe, die das leistet bei gleichzeitig sehr geringen Ansprüchen an die Stromstärke. Denn schon in einem an jede Hausleitung an Stelle einer Glühlampe ohne weiteres anschließbaren Modell erfüllt sie die Fixpunktforderung auf das strengste, ohne daß sich äußerlich das Spiel der die Kohlen haltenden Hebelsysteme irgendwie bemerkbar machte. Mithin brennt sie ebenso ruhig und geräuschlos und frei von jeder Schwankung der Helligkeit (bei der 4 Amp.-Lampe: 360 Normalkerzen), wie es die Glühlampen tun.

Für wissenschaftliche mikro- und makro-photographische Arbeiten habe ich daher in der zitierten Abhandlung die Ewon-Lampe als die ideale Lichtquelle bezeichnet.

Das gilt erst recht, sowohl wegen des den Bogenlampen eigenen rein weißen Lichtes, als wegen des der Ewon-Lampe speziell eigentümlichen völlig ruhigen, von jeglichem Flackern und sonstigen periodischen Helligkeitsschwankungen freien Brennens, für die subjektive mikroskopische Beobachtung.

Wesentlich wegen des gleichmäßigen Lichtes des Nernstbrenners hat man neuerdings bei der Konstruktion von Mikroskopierlampen und Mikro-Scheinwerfern zu dieser Lichtquelle gegriffen. Es bleibt aber gegen das Nernstlicht, außer den ihm in technischer Beziehung anhaftenden Fehlern, die es bekanntlich als Lichtquelle für allgemeine Zwecke (in Wohnungen z. B.) sehr schnell durch die modernen Glühlampenarten wieder verdrängt werden ließen, einzuwenden, daß sein gelbes Licht für die Augen bei andauerndem Mikroskopieren ebenso schnell, bei empfindlichen Personen

wenigstens, schädigend wirkt, wie das Flackerlicht der älteren Bogenlampensysteme mit automatischer oder Handregulierung¹⁾ und wie das Petroleumlicht.

Obgleich nun die im Ewon-Miniatur-Scheinwerfer verwendete Lampe hinsichtlich der Betriebsstromstärke die geringsten Ansprüche ($3\frac{1}{2}$ —4 Amp.) stellte, die man bis dahin bei automatisch regulierenden Bogenlampen kannte, weshalb ich sie auch als beste Lichtquelle für die subjektive Beobachtung empfehle, ist jetzt die Konstruktion einer Ewon-Lampe gelungen, die schon bei einem Stromverbrauch von nur 2 Amp. alle Tugenden der 4 Amp.-Lampe zeigt, d. h. eine absolut gleichmäßig und geräuschlos brennende automatisch regulierende Fixpunktbogenlampe darstellt, die ohne weiteres an jede Hausleitung angeschlossen werden kann, eine Brenndauer von 3 Stunden hat und 200 Normalkerzen leistet.

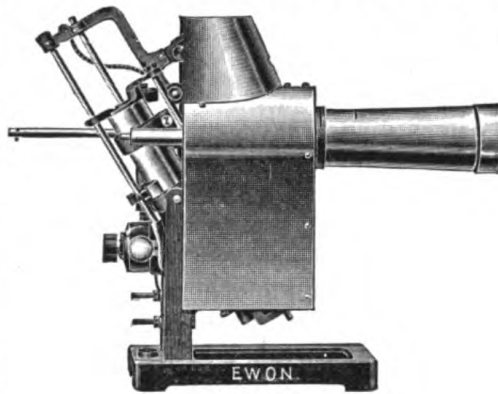


Fig. 1.

Es ist diese neue Lampe der trefflichen Münchener Firma die kompensiöseste selbstregulierende Bogenlampe, die überhaupt bisher gebaut worden ist.

Fig. 1 und Fig. 2 (letztere die Lampe mit nach vorn gezogenem und dann zur Seite geklapptem Gehäuse zeigend) dürften eine eingehendere Beschreibung der Lampe überflüssig machen.

Lampe und Lampengehäuse, sowie Fuß sind stark vernickelt. Der regulierbare Widerstand kann auf den Tisch gestellt und dann mit zum Erwärmen von Reagentien verwendet, oder auch seitlich am Mikroskopierteisch mittels Öse aufgehängt werden.

Ein vorn auf dem Kondensortubus der Lampe aufsteckbarer Spiegel gestattet, auch für andere Zwecke, als mikroskopische, z. B. für Mikro- und Makrophotographie, zur Beleuchtung größerer Objekte, das Licht der Lampe zu verwenden.

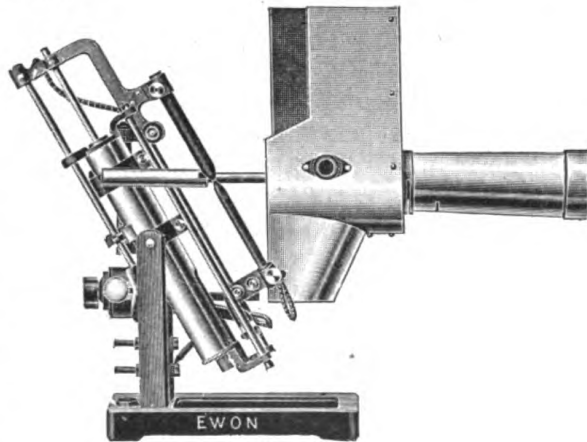


Fig. 2.

Die Lampe kann nämlich, da ihr Fuß das normale photographische Stativmuttergewinde trägt, auf jedem beliebigen photographischen Stativ, selbstverständlich auch auf dem für die größeren Miniaturscheinwerfer gebauten ausziehbaren, auf Rollen laufenden, eisernen Stativ der Firma G. Geiger-München (26 M) befestigt werden. Da der Spiegel den Licht-

¹⁾ Ganz davon abgesehen, daß die Betätigung einer Handregulierlampe (wie z. B. die Firma C. Zeiß in ihrer Druckschrift Mikro 308, p. 3 sehr richtig ausführt) während der subjektiven mikroskopischen Beobachtung sehr lästig und störend ist!

kegel nach allen Seiten und also unter beliebigem Winkel auf das zu beleuchtende Objekt zu richten gestattet, kann eventuell ein ziemlich großes Objekt hell beleuchtet werden. Denn 1,50 m von der vorderen Linse oder von dem Spiegel des Kondensortubus entfernt erhält man einen Lichtkreis von über $\frac{1}{3}$ m Durchmesser.

Bei zusammengeschobenem Kondensortubus ist der Lichtkreis 25 cm vor der vorderen Linse gerade so groß (ca. 6 cm Durchmesser), daß er den Spiegel eines dort aufgestellten Mikroskopes füllt.

Für subjektive Beobachtung ist dann aber immer noch, der großen Helligkeit wegen, selbst wenn mit stärksten Systemen gearbeitet wird, durch Einlegen einer Mattscheibe in die Kondensoriris des Mikroskopes und eventuell entsprechende Einengung der Irisöffnung für genügende Dämpfung der Lichtfülle zu sorgen. Senkt man den Abbeschen Kondensor, erhält man sogar für ganz schwache Vergrößerungen ein angenehm weiß und gleichmäßig hell erleuchtetes Gesichtsfeld. Läßt man die Mattscheibe weg und arbeitet mit entsprechend hoch gekurbeltem Abbeschen Kondensor, so ist die Beleuchtung des Präparates selbst bei Anwendung längster Balgenauszüge und stärkster Objektive und Okulare eine völlig ausreichende. Ausziehen des Lampenkondensortubus um 10 cm (ohne Veränderung der Entfernung von Mikroskop und Lampe) bedingt, daß der Lichtkreis noch außerordentlich viel heller und natürlich kleiner (3 cm Durchmesser) wird. Die so resultierende Helligkeit genügt, wie ich mich überzeugt habe, selbst bei ganz extremen Anforderungen, wie sie die moderne Dunkelfeld-Mikroskopie und Dunkelfeld-Momentphotographie stellt.

Die Möglichkeit, innerhalb derartiger Extreme die Beleuchtung des Präparates in einfachster Weise abstufen zu können, ist ein besonderer Vorteil, den der mit einem dreiteiligen Linsensystem ausgerüstete, ausziehbare Kondensortubus der Lampe bietet. Ein weiterer, nicht zu unterschätzender ist die starke Wärmeabsorption. Selbst wenn das Präparat im Brennpunkt des Abbeschen Kondensors bei voller Öffnung der Iris steht, ist in Okularhöhe, wie unmittelbar zur Seite des Mikroskopsiegels eine Erwärmung mittels des Thermometers nicht nachweisbar. Der Mikroskopierende wird in keiner Weise belästigt. Das Präparat aber wird unter diesen Verhältnissen nur um 6—7° C, wenn der Kondensor etwas gesenkt und die Iris etwas geschlossen wird um 1—2° C, wenn eine kleine Kühlküvette mittelst besonderer Klemmfassung (in ähnlicher Weise können auch Matt- und Blaugläser vorgesteckt werden, letztere speziell für therapeutische Zwecke berechnet) vor die vordere Kondensorlinse gesteckt wurde überhaupt nicht meßbar erwärmt.

Das Lampengehäuse ist mittelst Schneckentrieb neigbar, so daß die Lampe wie erwähnt, dicht vor dem Mikroskop aufgestellt werden kann. Auf sehr flachen Mikroskopiertischen (50 cm und weniger tief) wird man die Lampe quer stellen und den Spiegel am Tubus aufstecken.

Die Lampe ist komplett mit dem nötigen Zubehör zum Preise von 155 \mathcal{M} von G. Geiger, München, Mathildenstr. 12 I, G. R. zu beziehen.

Nachdruck verboten.

Über ein densimetrisches Laugenbesteck für den Gebrauch auf dem Mikroskopiertisch.

Von Dr. Max Wolff, Bromberg-Schröttersdorf,

Abteilung für Pflanzenkrankheiten am Kaiser-Wilhelms-Institut für Landwirtschaft.

Mit 1 Textfigur.

In No. 20/25 des Bd. 32 dieses Centralblattes p. 605—606, 1912, habe ich ein sehr kompendiöses, zum Gebrauche auf dem Mikroskopiertisch besonders geeignetes alkoholometrisches Meßbesteck, das die Firma E. Koellner, Jena, Glastechnisches Institut, herstellt, näher beschrieben.

Die Idee, den Meßbereich des Tralleschen Prozentaräometers auf 3 Instrumente, von denen folglich jedes in seinen Ausmessungen sehr klein gehalten werden kann, zu verteilen und damit die aräometrische Prüfung sehr geringer (13 ccm im Minimum) Flüssigkeitsmengen zu ermöglichen, ist so wertvoll für die Laboratoriumspraxis, gestattet in Gestalt des erwähnten kleinen Instrumentes einen so sparsamen Verbrauch der in Frage kommenden Reagentien, daß die Konstruktion eines dem gleichen praktischen Endzweck dienenden kleinen densimetrischen Besteckes, das die genannte Jenenser Firma jetzt in den Handel bringt, lebhaft zu begrüßen ist und eine kurze Beschreibung an dieser Stelle rechtfertigt.

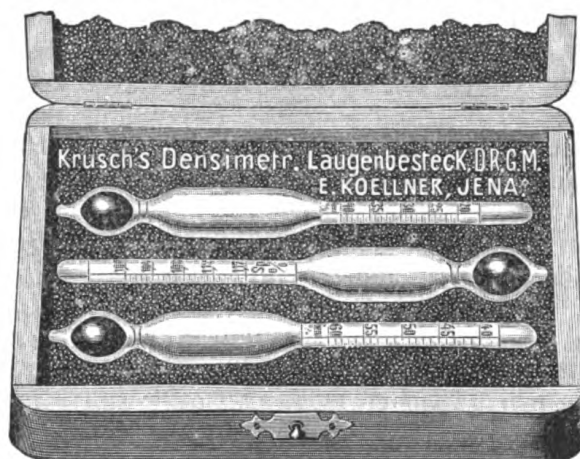


Fig. 1.

Das „Densimetrische Laugenbesteck nach Krusch“ hat fast dieselben Dimensionen wie das alkoholometrische Besteck (vgl. die Fig. 1 l. c.). So können in einem geeigneten zylindrischen Gefäß schon sehr kleine Mengen der zu untersuchenden Lauge, von ca. 15 ccm an, geprüft werden.

Die Densimeterskala ist hier so eingerichtet, daß sie für Kalilauge mit einem Gehalt von 0—60 Gewichtsproz. KOH auf der linken Seite ganze Gewichtsproz., rechts dagegen von 5 zu 5 Gewichtsproz. das spezifische Gewicht angibt.

Die Skala ist auch bei diesem Densimeter-Besteck auf 3 Instrumente verteilt.

Densimeter No. 1 ist für 0—20 Gewichts-Proz. einer Kalilauge von 1,000—1,177 sp. Gew.,

Densimeter No. 2 ist für 20—40 Gewichts-Proz. einer Kalilauge von 1,177—1,411 sp. Gew.,

Densimeter No. 3 ist für 40—60 Gewichts-Proz. einer Kalilauge von 1,411—1,667 sp. Gew.

geteilt.

Die Teilung, welche die Gewichtsproz. angibt, ist auf Kalilauge, als die zu mikroskopischen Arbeiten der verschiedensten Art am meisten gebrauchte Lauge berechnet. Da die z. B. zum Mazerieren oder zum Korrodieren benutzte Lauge durch Aufnahme von Wasser aus der Luft sehr schnell ihre Konzentration zu ändern pflegt (was natürlich besonders leicht in Deckelschalen, Farbklotzen eintritt, wenn mit der Lauge gearbeitet wird), so ist es gerade hier besonders wichtig, mit einem handlichen Instrument jederzeit genau bestimmen zu können, wieviel Gewichtsproz. eine gebrauchte Lauge noch enthält. Denn durch diese Feststellung wird die Lauge wieder für weitere Arbeiten verwendbar und kann durch Zufügen von Wasser, oder von frischem KOH jederzeit auf eine gewünschte Konzentration wieder genau eingestellt werden.

Damit ist aber die Anwendbarkeit des kleinen Instrumentes noch nicht umgrenzt. Handelt es sich z. B. um eine Phosphorsäure unbekannter Konzentration, in der das erste Densimeter bis zum Strich 1,177 spez. Gew. einsänke oder durch Hinzufügen von Säure (oder durch Verdünnen) auf diesen Teilstrich eingestellt würde, so kennt man dann eben das spezifische Gewicht der Säure und vermag durch Nachschlagen irgendeines in Laboratorien gebräuchlichen Tabellenwerkes die Korrelation zwischen diesem spezifischen Gewicht und dem Säuregehalt in Gewichtsproz. festzustellen. Kennt man letzteren, so ist die Säure, die man sonst nur hätte wegschütten können, unbedenklich weiter zu Arbeiten aller Art, Herstellung von Gemischen nach bestimmter Vorschrift und ähnlichem zu gebrauchen.

Es ist eine ziemlich große Zahl von in der Mikrotechnik, also meist in kleineren Mengen gebräuchlichen Reagentien, die auf solche Weise mit dem Liliput-Densimeter geprüft und also brauchbar erhalten werden können. Die Genauigkeit der Bestimmung wird für weitaus die meisten Zwecke genügen.

Bedingung ist lediglich, daß das spez. Gewicht der zu prüfenden Lösungen und Gemische nicht unter 1 und nicht über 1,667 liegt.

Ich habe das Instrument eingehend geprüft und fand die Ausführung des Besteckes in jeder Beziehung vorzüglich.

Wie das erwähnte alkoholometrische Meßbesteck stellt auch das densimetrische Laugenbesteck ein Präzisionsinstrument ersten Ranges dar und es wird sich sicher ebenso schnell und allgemein, wie sein Vorgänger in jedem rationell eingerichteten Laboratorium als unentbehrlicher Bestandteil des für mikroskopische Arbeiten zur Verfügung stehenden Instrumentars einbürgern.

Besonders wenn man, wie es z. B. der Pflanzenpathologie vielfach genötigt ist zu tun, sehr zarte Insekten mit einer Lauge von bestimmter Konzentration, die genügend schnell und doch schonend arbeiten soll, korrodieren will, ist die Prüfung der zu verwendenden Lauge mittelst des densimetrischen Besteckes stets sehr zu empfehlen.

Neue Literatur,

zusammengestellt von

Prof. Dr. OTTO HAMANN,

Oberbibliothekar der Kgl. Bibliothek in Berlin.

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zu Pflanzen.

Krankheitserregende Bakterien und Parasiten.

- Kirchner**, Die Roncetkrankheit der Reben. (Mitt. d. Dtschn. Weinbau-Ver. Jg. 7. 1912. No. 10. p. 332—336.)
- Mazé, P., Ruot, et Lemoigue**, Recherches sur la chlorose végétale provoquée par le carbonate de calcium. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 155. 1912. No. 7. p. 435—437.)
- Nutting, C. C.**, The fungus of the chestnut-tree blight. (Science. N. Ser. Vol. 35. 1912. No. 906. p. 717—724.)
- Petri, L.**, La durfee des vignes greffées et le Phylosera. (Rev. de viticult. Année 19. 1912. No. 977. p. 262—268.)
- Reckert, J.**, Ein Eichenschädling. (Ill. landw. Ztg. 1912. No. 78. p. 725. Mit Abb.)
- Rossi, Giacomo, Naso, Giosue e Majmone, Bartols**, Sulla etiologia della Gommosi degli alberi da frutta. Ricerche critiche e sperimentali. Portici 1911. 98 p. 1 Taf. 8°. (Ann. d. R. Scuola sup. d'Agric. in Portici. Vol. 10.)
- Rudolph**, Beiträge zur Kenntnis der sogenannten Septoria-Krankheit der Fichte. (Naturw. Ztschr. f. Forst- u. Landw. 1912. Heft 8. p. 411—415.)
- Schander, Rich.**, Versuche zur Bekämpfung des Flugbrandes im Weizen und Gerste mittels Heißwassers und Heißluft. (Mitt. d. K. W. Inst. f. Landw. i. Bromberg. 1912. Bd. 4. Heft 5. p. 416—492. Mit 7 Abb.)
- Schmitthenner, F.**, Über die Reblausfestigkeit der amerikanischen Reben. (Mitt. über Weinbau u. Kellerw. 1912. No. 7. p. 109—112, No. 8. p. 118—122.)
- Schwangart**, Wissenschaftliche Arbeiten über Rebenschädlinge. (Mitt. d. Dtschn. Weinbau-Ver. Jg. 7. 1912. No. 10. p. 340—343.)
- Smith, Erwin F.**, On some resemblances of crown-gall to human cancer. (Science. N. S. Vol. 35. 1912. No. 892. p. 161—172.)
- Sorauer, Paul**, Untersuchungen über Gummifluß und Frostwirkungen bei Kirschbäumen. III. Die künstliche Erzeugung des Gummiflusses. (Landw. Jahrb. 1912. Bd. 42. Heft 5. p. 719—750. Mit 36 Taf.)
- Sperling, E.**, Der Einfluß des Steinbrandes auf die Form der Weizenähren. (Ill. landw. Ztg. 1912. No. 87. p. 793. Mit Abb.)
- Störmer, K., u. Kleine, R.**, Pflanzenpathologische Tagesfragen. VI. Über das Auftreten von Fußkrankheit an Weizen und Roggen. (Ill. landw. Ztg. 1912. No. 62. p. 564; Deutsche landw. Presse No. 62. p. 718.)
- , Pflanzenpathologische Tagesfragen. VII. Krankheiten der Kartoffeln. (Deutsche landw. Presse. 1912. No. 69. p. 796. Mit Abb.)
- Stranák, Fr.**, Ein Beitrag zur Erkenntnis der phytopathologischen Bedeutung der Getreideblasenfüße. (Deutsche landw. Presse. 1912. No. 67. p. 771. Mit Abb.)
- Voges, Ernst**, Zur Fußkrankheit des Getreides. (Deutsche landw. Presse. 1912. No. 71. p. 815, No. 72. p. 823. Mit Abb.)
- , Zur Geschichte der Blattrollkrankheit. (Fühlings landw. Ztg. 1912. H. 16. p. 542—553.)
- Werner, Herm.**, Das Auswintern der Saaten. (Ill. landw. Ztg. 1912. No. 78. p. 721.)
- Zacher, F.**, Notizen über Schädlinge tropischer Kulturen. (Der Tropenpflanzer. 1912. H. 9. p. 484—493. Mit 14 Abb.)
- , Pflanzenschädliche Milben. (Deutsche landw. Presse. 1912. No. 69. p. 795. Mit Abb.)

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien und Parasiten.

Pflanzenschutz.

- Andresen, Siegf.**, Die Vertilgung schädlicher Tiere und Pflanzen. (Handb. d. prakt. Erfahrung u. Rezepte. 95 p. 8°. Berlin (Trowitzsch & Sohn) 1912. In Pappbd. №. 1.—.)
- Eichinger**, Bekämpfung der Kaffeewanze. (Der Pflanze. 1912. No. 6. p. 312—316.)
- Fleischmann, O.**, Werden und Wirken des Vogelschutzes. (Mitt. d. Deutschen Landw. Gesellsch. 1912. No. 35. p. 498, No. 36. p. 509. Mit Abb.)

- Influence des bouillies cupriques sur les spores des champignons du groupe des Isariées. (Rev. de viticult. Année 19. 1912. No. 985. p. 517—519.)
- Lang, W.**, Zur Bekämpfung der Feldmäuse. (Prakt. Blätter f. Pflanzenbau usw. 1912. No. 8. p. 85—89.)
- Müller, H. C., Molz, E., u. Morgenthaler, O.**, Saatschutzmittel. (Deutsche landw. Presse. 1912. No. 75. p. 862.)
- Rammstedt**, Schweflige Säure zur Vertilgung von Getreideschädlingen und Ungeziefer in Mühlen, Getreidelagern und im Landwirtschaftsbetriebe. (Die Mühle. 49. Jahrg. 1912. No. 17. p. 355—358.)
- Schander, R.**, Ein neuer Apparat zur Bekämpfung von Rübenschädlingen. (Blätter f. Zuckerrübenbau. 1912. No. 15. p. 241—245. Mit Abb.)
- Schwangart**, Die Bekämpfung der Rebenschädlinge und die Biologie. (Mitt. d. Dtschn. Weinbau-Ver. Jg. 7. 1912. No. 9. p. 310—317 [Schluß].)
- Spieckermann**, Die Lage des Pflanzenschutzes in Deutschland. (Fühlings landw. Ztg. 1912. H. 20. p. 682—693.)

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

- | | |
|--|---|
| <p>Arcichovskij, V., Über die Methoden zur Gewinnung mikroorganismenfreier Samen, p. 421.</p> <p>Hanzawa, Jun., Notiz über Eierkonservierung in China, p. 418.</p> <p>Lipman, Chas. B., Antagonism between Anions as affecting Ammonification in Soils, p. 382.</p> <p>Molz, E., Richtigstellung der Entgegnung von Dr. Max Munk zu meinen Bemerkungen über dessen Arbeit: „Bedingungen der Hexenringbildung“ bei Schimmelpilzen“, p. 353.</p> <p>Munk, Max, Zur letzten Replik des Herrn Dr. E. Molz, p. 359.</p> <p>Münter, F., Über Actinomyceten des Bodens, p. 365.</p> | <p>Oberstein, O., Sciara nitidicollis Meg. = Larven als Schädiger junger Kulturen von Mesembrianthemum pseudotruncatellum Berger, p. 409.</p> <p>Rahn, Otto, Methode zur Schätzung der Anzahl von Protozoen im Boden, p. 419.</p> <p>Thöni, J., und Thaysen, A. C., Micrococcus mucofaciens n. sp., ein Milchsäurebakterium, p. 359.</p> <p>Werth, E., Zur Kenntnis des Sempervivum-Rostes, p. 395.</p> <p>Wolff, Max, Eine neue Mikroskopierlampe, p. 426.</p> <p>—, Über ein densimetrisches Laugenbesteck für den Gebrauch auf dem Mikroskopiertisch, p. 429.</p> |
|--|---|

Neue Literatur. p. 431.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 20. Dezember 1912.

— Hofbuchdruckerei Rudolstadt. —



E. Werth gez.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Ausgegeben am 15. Februar 1913.

Nachdruck verboten.

A Bacterium causing Ropiness in Beer.

By F. E. Day and Julian L. Baker,

It has long been known that under some conditions certain bacteria when grown in media containing as a rule carbohydrates and proteins, can render them viscous and capable of being drawn out into ropy threads. Considerable trouble is occasioned in some industries by this phenomenon and it is frequently a matter of difficulty to determine the cause of the outbreak. In all the cases which have been investigated "ropiness" has been shown to be concomitant with bacterial action. The phenomenon is commonly associated with sugar, wine, milk, bread, and beer, and a number of organisms accredited with the power of producing ropiness have been isolated by different observers, but a perusal of the literature fails to throw much light on the matter. Many of the statements are vague and there appears to have been a general difficulty — which we can fully confirm — in growing some of the organisms isolated from a ropy medium and especially in reproducing the ropy condition.

Although we have confined our studies to the organisms isolated from ropy wort, beer, etc., it will be germane to this inquiry to refer to organisms producing ropiness in other materials.

So far as the organisms causing ropiness in bread are concerned, these may be differentiated from those described in this paper, as the former all appear to be spore-forming organisms of the "potato bacillus group" among which may be mentioned *B. panis viscosus* Vogel (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 26. 1897. p. 398), *B. mesentericus fuscus*. Flüggé, see S. J. Watkins (Journ. Soc. Chem. Ind. Vol. 25. 1906. p. 350) also Thomann (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 6. 1900). von Czadek and Kornauth (Zeitschr. f. d. Landw. Versuchsw. i. Österr. Bd. 5. 1892). None of the organisms we isolated either developed spores, or produced ropiness in bread.

Organisms capable of rendering milk ropy have been described and a summary of their properties together with a bibliography is given by J. Golding (Journ. Board of Agric. Vol. 18. 1912. p. 991, see also Leichmann (Landw. Versuchstat. Bd. 43) and G. Troili-Petersson (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 28. 1899. p. 32). It appears however to be unusual for any organism to possess the property of rendering both milk and beer ropy.

In the sugar industry, the mucilage-producing organisms are a continual source of trouble. Not only in the extracted material do *Streptococcus* (*Leuconostoc*) *mesenteroides*, and allied organisms produce ropiness and inversion of the cane sugar, — P. van Tieghem (Ann. de sci. nat. Bot. Sér. 6. T. 7. p. 78), Leisenberg and Zopf (Beitr. z. Phys. u. Morph. nieder. Organ. Leipzig 1892), Koch and Hosaeus (Centralbl. f. Bakt. Bd. 26. 1894), Boekhout (Ibid. 1911. p. 6), Schardinger (Ibid. Bd. 8. 1902. p. 144—147, 175—181), Laxa (Zeitschr. f. Zuckerind. in Böhm. Bd. 26. 1901. p. 122), Kramer (Monatsheft f. Chem. Bd. 14. 1889. p. 467), Schone (Zeitschr. d. Deutsch. Zuckerind. Bd. 51. 1901. p. 453), Lewton-Brain and Deerr (Rep. of Exp. Stat. of Hawaii Sugar Plant. Assoc. 1909), Maassen (Arb. a. d. biol. Abt. f. Land- u. Forstwiss. a. Kaiserl. Gesundh.-Amte. 1905. p. 1—30), but organisms of this group and others are the cause of diseases of sugar canes and sugar beets, — Cobb (Centralbl. f. Bakt. 1896. p. 95), Busse (Ibid. 1897. Bd. 65. p. 149), Ward and Green (Proc. Roy. Soc. Vol. 65. 1899. p. 65—84), C. F. Smith (Centralbl. f. Bakt. Bd. 13. 1904. p. 729; Chem. Zeitschr. Bd. 29. 1905. Rep. 18) and R. G. Smith (Centralbl. f. Bakt. Bd. 9. 1902. p. 805).

Zweite Abt. Bd. 36.

28

More closely allied to the organisms producing ropiness in beer are those which do so in wine and must, in which field several investigations have been carried out. E. Kramer (loc. cit.) while discrediting Pasteur's *Micrococcus viscosus* (Etudes sur la Bière) describes an organism to which he gives the name *Bacillus viscosus vini* capable of producing ropiness in wine. Other researches in this field have been recorded by Cramer (Weinbau u. Weinhand. 1890), Bordas, Joulin and Raskowski (Compt. Rend. T. 126. 1908. p. 1050), Meißner (Centralbl. f. Bakt. 1899. p. 5), Kayser and Manceau (Compt. Rend. T. 142. 1906. p. 725; T. 143. p. 247; 1908. T. 146. p. 92; 1909. T. 149. p. 740). These last observers consider it possible that the *Bacillus oblongus* of Boutroux (Ann. de l'École Norm. Sup. T. 10. p. 67) may be the cause of ropiness in wine, and they and other workers draw attention to the similarity of the organisms described by them to those causing the mannitol fermentation of wine (Gaijon and Dubourg, Ann. Inst. Past. T. 7. 1894. p. 1901. 15., Mazé and Perrier, Ann. Inst. Past. 1903).

Numerous other cases of ropiness resulting from bacterial action in industrial liquids have been reported, for example in tannery liquor — Andreasch (Der Gerber. Bd. 21. 1897. p. 15) and in pharmaceut. infusions, Bräutigam (Pharm. Centralhalle. Bd. 32. 1891., Bd. 33. 1892; Chem. Zeit. Bd. 15. Repert. 230), Ritsert (Centralbl. f. Bakt. Bd. 11. 1892. p. 236) while in suitable media many common, air, water and soil organisms develop ropiness, e. g., some cultures of *Bacillus subtilis*, *Bacillus fluorescens liquefaciens*, *Bacillus lactis aerogenes*.

The literature of ropy beer is fairly extensive, Pasteur (Études sur la Bière) described an organism (*Micrococcus viscosus*) capable of rendering beer ropy, but the first to isolate such organisms in pure culture was Lindner (Wochenschr. f. Brau. Bd. 6. 1889. p. 181) and his work has been more recently followed up by Schönfeld (Jahrb. d. Versuchs- u. Lehranst. f. Brau. Berlin. Bd. 7. 1904. p. 359, Bd. 8. 1905. p. 90, Bd. 9. 1906. p. 415, Bd. 10. 1907. p. 546) and Zeidler (Wochenschr. f. Brau. Bd. 7. 1890. p. 1212) whose paper has been overlooked by more recent investigators. While these observers worked with Berlin White Beer, van Laer isolated three varieties with intermediate forms from ropy Belgian beers (Mém. cour l'Acad. Roy. de Belgique. 1889. 43.), van Laer and vander Hulle (Mém. cour l'Acad. Roy. de Belgique 1891) and van Dam a somewhat similar species from English beer (Bull. de l'Assoc. des Anc. Elèv. de l'Éc. de Brass. Louvain. T. 1. 1896. p. 3; Bull. de l'Assoc. Belg. de Chem. 1896. 9.), Fellowes (Trans. North of England. Tech. Brew. 1894. p. 3) isolated organisms from ropy beer but was unable to reproduce ropiness, while Brown and Morris (J. Fed. Inst. Brew. T. 14. 1895. p. 1.) have isolated and given a brief description of two organisms associated by them with ropiness. Hennenberg (Rep. 7th. Int. Cong. App. Chem. 1909. Sectn. 6B. 175) also indicated the frequent presence of an organism in wort capable of rendering it ropy.

The information embodied in these investigations shows that the conditions affecting ropiness are very obscure. So far as beer is concerned the German observers have confined their researches to Berlin White Bier, and van Laer to spontaneous Fermentation Belgian Beer. Both products are exceptional and it is possible that the causes of disease in them may differ also. van Dam (loc. cit.) and Brown and Morris (loc. cit.) although they isolated from English beers organisms causing ropiness, made no systematic attempt to study the behaviour of the isolated organisms either in different culture media or in beer.

In the absence of precise knowledge concerning the bacteria causing ropiness only palliative measures are possible when an outbreak of the disease has to be overcome.

Since ropiness occasions much trouble when it becomes established in top fermentation breweries, it appeared to us that a study of the bacteria causing ropiness in wort and beer would contribute to the further knowledge of the disease and its eradication when it occurs. A number of samples of ropy beer derived from three different breweries which will be referred to as A, B, and C, were examined.

Sample I was a ropy beer. An organism was isolated from it which died during the course of this investigation.

Sample II was an ale from Brewery C six weeks old. The ale was distinctly ropy and a number of organisms were isolated.

Samples III and IV were two stouts from Brewery A.

Samples V and VI were culture plates exposed in Brewery C.
 Sample VII was a ropy ale from Brewery C.
 Sample VIII was a ropy wort from Brewery C.
 Samples IX and X were ropy worts from Brewery B.
 Sample XII was dust from the roof of Brewery C.
 Sample XIV was a ropy stout from Brewery C.
 Sample XV was a ropy ale from Brewery C.
 Sample XVI was a ropy Porter from Brewery A.
 Sample XIX was a ropy cane sugar solution at Brewery A.
 Samples XXI, XXII, and XXIII were ropy stouts from Brewery A.
 Sample XXVI was a normal stout at Brewery A.
 Sample XXVII was a ropy stout at Brewery A.
 Sample XXVIII was a ropy sugar solution at Brewery A.

In all some 150 organisms were isolated, and their manner of growth observed. Isolation was effected by spreading small drops of the infected material on wort agar plates and incubating at 27° C for two or three days.

Colonies having a wet appearance and a gummy or gelatinous consistency were transferred to wort, and preference was given in the subsequent experiments to those which rendered the liquid ropy or deposited a ropy sediment. Finally by testing the growth of the organism in wort and beer, one specific organism was isolated from each specimen which possessed a rope-producing property in a marked degree.

For the closer examination and classification of these organisms their growth was studied in a variety of culture media. Two classes of media were employed. The first consisted of carefully standardised broth, broth gelatin peptone, peptone sugars and milk, made up to a reaction of +1 (i. e. every 100 cc requires 1 cc N₁NaOH to render it neutral to phenolphthalein) cf. Report of the Committee on Standardisation of Methods for the Bacteriological Examination of Water — the composition of these media was as follows: — J. State Medicine Vol. 12. 1904. p. 471.

- (a) **Broth** — 0.5 per cent „Lemco“ (meat extract), 0.5 per cent salt, and 1 per cent of Witte's peptone.
- (b) **Broth Gelatin**. The above with the addition of 12 per cent gelatin.
- (c) **Peptone**. 1 per cent of Witte's peptone, and 0.5 per cent of salt dissolved in water.
- (d) **Peptone Sugars**. The above with the addition of 0.5 per cent of different sugars.
- (e) **Milk**. Separated milk with the addition of Litmus.

The second comprised unstandardised media of malt wort (Sp. Gr. 1.045) wort gelatin (10 per cent) wort agar (2 per cent) and a number of sugars and polyhydric alcohols dissolved at the rate of 5 per cent in yeast water (1 part yeast to 8 of water). Slices of potato were used, and the selected organisms were also seeded into beer under varying conditions.

In the following table are recorded the cultural characters of the organisms we examined.

Explanation of Table. (1) All incubations carried out at 27°, except in the case of the gelatin cultures, which were kept at the Laboratory temperature.

(2) The tests were kept under observation for two weeks, and the gelatine and milk tests for two months.

(3) + indicates that any particular test was carried out with any organism in whose column it occurs, 0 that the test was not carried out.

(4) The following convention has been observed in recording the acidity produced in the yeast water media after 14 days:

28*

Much	acidity indicates more than 1.0 % acid calculated as Acetic acid.
Marked	" " from .25 to 1.0 % " " " "
Slight.	" " about .20% " " " "
Trace	" " .10% " " " "

In the cases of milk and peptone media "acid production" indicates any definite acidity to wards Litmus. "Strong acidity" is 0.5 per cent or more (as Acetic acid).

A consideration of this table shows that the organisms can in the first instance be divided into two groups (a) those which oxidise alcohol to acetic acid, and do not produce gas when grown in media containing carbohydrates (b) those which do not oxidise alcohol, but produce gas from carbohydrates. In the first group are included II, III, IV, VIII, X, XIV, XVI, XX, XXI, XXIII, and XXVI, and in the second, VIII, IX, XVII, and XVIII.

First group (General Character).

When grown in unhopped wort the organisms appear as motile or non-motile short rods varying in size from 0.8 to 3 μ long, and 0.5 to 0.8 μ in thickness (usually $1.2 \times 0.8 \mu$); they are generally united in pairs although single elements and chains are frequent in some cases. They stain weakly by Gram's method except in the less typical members of the group. No spore formation was observed and "involution forms" except in one case (XIV) were rare. Growth is feeble in broth and in peptone-solution, with or without sucrose or lactose, and in milk. When glucose is present together with peptone a vigorous growth results with the production of much sediment, but little film. No ropiness occurs in the earlier stages, but is generally developed after several days. On broth gelatin the growth is very slight, non-spreading, and of a translucent greyish appearance. The stab growth is so slight as to be almost invisible, and the growth on potato is only marked by an ill-defined patch, moister than the rest.

To unhopped wort (Sp. Gr. 1.040) the organisms of this group first impart a uniform turbidity, a ring is then formed, grey and gelatinous and a slight grey submerged gelatinous film. Gradually a ropy sediment forms, and the liquid becomes fairly clear and decidedly ropy. This latter property disappears in a few weeks. On wort agar the growth is an almost transparent grey wet streak, raised, with a sharply defined edge. The growth is not exactly jelly-like nor ropy, but suggests both; it becomes cloudy and opaque with age. In wort gelatin stab the growth is almost transparent and very slightly spreading. The surface colony is of a somewhat purple-brown colour, and has a radiating structure while it is drier and less transparent than the growth on wort agar. No liquifaction of the jelly occurs, but in the case of X. a softening, due perhaps to the formation of acid.

Grown in media containing alcohol the organisms form a slight film and oxidise the alcohol rapidly to acetic acid; glucose is also oxidised chiefly to gluconic acid (identified by its phenylhydrazide, and the analysis of the zinc and calcium salts). In some cases galactose and maltose are attacked. The optimum temperature of growth appears to be about 20° to 25°, and young wort cultures are killed by an exposure to a temperature of 60° for five minutes.

The organisms II, III, IV, and XIII are indistinguishable, while the remaining organisms present small differences: e. g. X. is somewhat smaller in size, and oxidises sugars other than glucose, XIV and XVI were motile

when first isolated. Thus it seems that II, III, IV, and XIII may be regarded as a type with the other members of the group as variants. XXI, XXIII, and XXVI differ very slightly, the others to a greater extent.

We have compared the general characteristics of the group with other rope-producing organisms e. g. *Pediococcus viscosus* (Lindner), *Pediococcus cerevisia* (Balcke), *Bacillus viscosus* I and II (van Laer), *Bacillus viscosus* III (van Dam), *Bacillus oblongus* (Boutroux) and *Bacterium albuminosum* (Zeidler and Lindner).

The group of organisms we have described belong clearly to the acetic acid group and in this respect resemble *Bacterium albuminosum*, but differ markedly from it in the growth on solid culture media. We propose for the group the name *Bacterium aceti viscosum* and to include in it all organisms capable of producing ropiness in beer whose natural characters agree closely with those given as generally common to the strains isolated by us.

In every case of ropiness in English beers which we have investigated we isolated strains of *Bacterium aceti viscosum*, and in this connection it may be of interest to record the behaviour towards beers of some of the strains isolated. All of them when in a fresh vigorous condition produce ropiness in new stouts with ease, and in ales with some difficulty. The time taken for ropiness to become apparent varies with the degree of infection. The organisms readily survive fermentation and subsequently render the beer ropy. If air has access to the beer during development of the organism considerable acidity — as much as 3 per cent of acetic acid in some cases — results. With these high acidities ropiness disappears, no ropy beer having been observed with an acidity exceeding 1.5 per cent (acetic acid). Our experiments also demonstrate that all beers are not equally susceptible to the infection, the development of ropiness probably depending on some constituents of beer as yet undetermined. We have ascertained that varying the quantity of hops or the amount of carbohydrate and soluble protein within reasonable limits is without effect on the growth of *Bacillus aceti viscosum*.

Second group (General Characters).

The four organisms composing the second group have many characters in common. They are fairly short rods of medium length which stain readily by Gram's method. Their growth is vigorous in all the media employed, with development of much ropiness. This ropiness is produced from nitrogenous compounds and is independent of the presence of carbohydrates and polyhydric alcohols, these latter being decomposed with production of carbon dioxide and hydrogen. In starch jelly made up with yeast water, this decomposition is most noticeable, the starch jelly being broken up by the liberated gas, and a part of it separating out as gelatinous masses from a clear liquid.

A consideration of the characters of the members of this group shows the necessity for further sub-division. By reference to the table it will be seen that VIII and IX are two strains of the same organism, for they are almost indistinguishable except for the more intense ropiness induced in most media by VIII. These two differ markedly from XVII and XVIII by their

non-motility, and by their failure to produce acidity in many of the media employed. XVIII differs but slightly from XVII except for its greater vigour of growth. The cultural characters are sufficiently indicated in the table, but some observations on their growth in beer may be of interest. These organisms appear to be incapable of infecting beer directly, but if wort be infected they may survive fermentation. The only case in which any harmful effect was observed has been on those occasions when worts were heavily infected with VIII. With excessive infection the growth of the yeast introduced subsequently was interfered with, and a ropy beer of a high specific gravity and low alcohol content resulted, with a curious musty flavour. Even if the fermentation was not visibly affected, and the alcohol content and viscosity of the beer were normal, the offensive flavour was produced if the organism had developed to any extent in the wort.

These organisms differ altogether from *Bacterium aceti viscosum*. Judging from the published accounts they resemble certain water bacteria described by Zikes¹⁾ (Lindner, *Mikroskopische Betriebskontrolle*. 1909. p. 507).

Stag Brewery, Pimlico, London.

Nachdruck verboten.

Eine Modifikation der Untersuchungsmethode von Gärungsgasen.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Tübingen.
Vorstand: Prof. Dr. K. Wolf.]

Von Walther Frieber.

Mit 1 Textfigur.

Im Verlaufe meiner Untersuchungen über die von Bakterien gebildeten Gase wurde mein Augenmerk auf eine von Burri und Duggeli²⁾ angegebene Methode gerichtet. Diese hat vor der Verwendung der kleinen Gärungskölbchen von Smith, die zu quantitativen Untersuchungen ganz ungeeignet sind, entschieden zwei Vorzüge: Die ganze Gärung verläuft unter einheitlichen, anaëroben Bedingungen, und von den Gasen kann kein Teil in die Luft entweichen und sich somit der Bestimmung entziehen. Diese Fehlerquellen der Smithschen Gärkölbchen erkennend und vermeidend, bedienten sich Burri und Duggeli bei ihren Untersuchungen der sogleich zu skizzierenden Methode. Doch hat auch sie, wie jene den Nachteil, daß sie die Absorption der Gase nicht berücksichtigen läßt. Es ist daher nicht zu verwundern, wenn Burri und Duggelis Resultate mit den Versuchen von Keyes³⁾, der seine Kulturen im Vakuum wachsen

¹⁾ We have been unable to obtain a copy of Zikes original paper.

²⁾ Burri und Duggeli, Beiträge zur Systematik der *Coli aërogenes*-Gruppe nebst Beschreibung einer neuen Methode zur Untersuchung der Gärungsgase. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1909. p. 145.)

³⁾ Keyes, F., The Gas production of *Bacillus coli*. (Journ. of medic. Research. Vol. 21. 1909. p. 69; referiert nach Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 45. 1910. p. 248.)

ließ, nicht übereinstimmen. Keyes erhielt z. B. für *Bacterium coli* in Glukose

	im	
	Vakuum	Smith-Gärungskölbchen
Wasserstoff	43,56%	57,10%
Kohlendioxyd	55,73%	40,73%
demnach $H_2 : CO_2 = 1 : 1,3$		$= 1,4 : 1,$

also im Vakuum bedeutend an Wasserstoff reichere Gasgemische, und zwar das umgekehrte Verhältnis, wie in den Smith-Gärkölbchen. Burri und Dügeli fanden dagegen bei sechs Colistämmen in Glukose

	$H_2 : CO_2$, oder in %	$H_2 : CO_2$
dreimal	3 : 1	75 : 25
je einmal	5 : 2	71 : 29
„ „	2 : 1	67 : 33
„ „	3 : 2	60 : 40,

also alle Werte für Kohlendioxyd noch geringer und ungünstiger als die mit dem Smith-Kölbchen erhaltenen von Keyes. Da Lehmann und Neumann noch in der neuesten Auflage ihres Lehrbuches (1912) p. 99 die Methode von Burri und Dügeli derjenigen von Smith als eine „genauere“ gegenüberstellen, so scheint erstere bis dahin keinerlei Verbesserungen erfahren zu haben, jedenfalls solche bis heute nicht publiziert zu sein. Die Bedeutung, welche die Untersuchungen von Bakterien-gärungsgasen in systematischer und diagnostischer Hinsicht für die Bakteriologie erlangt haben, dürfte eine Betrachtung der erwähnten Methode rechtfertigen und als angebracht erscheinen lassen. Sie sei daher in ihren wesentlichen Punkten kurz besprochen.

Zwecks ihrer Ausführung bringt man etwa 10 ccm einer geimpften, noch nicht erstarrten Zuckeragarschüttelkultur in das geschlossene Ende einer ca. 40 cm langen Röhre von Reagensglasweite, bedeckt mit einer gewöhnlichen Agarschicht, welche in dem im Brutschrank horizontal gelagerten Rohre als leicht beweglicher Kolben in dem Maße nach der Mündung hin geschoben wird, wie der Zuckeragar durch die gebildeten Gase zerrissen wird. Die nach Beendigung der Gärung abgelesene Verschiebung des Deckagars gegen seinen ersten Stand wird der aus dem Zucker frei gewordenen „Gesamtgasmenge“ gleich gesetzt. Bis hier deckt sich der Gang ungefähr mit einer älteren, von Seiffert¹⁾ angegebenen Methode, bei welcher an Stelle des Deckagars eine Schicht Paraffin tritt. — Sodann wird das Rohr mit Wasser gefüllt und mit der Mündung nach unten in einen Wasserbehälter gestellt. Mit Hilfe eines am Ende hakenförmig gebogenen Drahtes werden die größeren Agarstückchen zerkleinert und die durch sie getrennten Gas-mengen vereinigt, wobei aber mit den alsbald ihrer Schwere wegen zu Boden fallenden Agarstückchen noch eingeschlossen gebliebene Gase mitgerissen werden und sich der Bestimmung entziehen können. Das bei dieser Operation event. noch frei werdende, vom Zuckeragar absorbierte Kohlendioxyd, dessen Absorption durch einen durch die Konsistenz des Agars ausgeübten Druck begünstigt war, und an und für sich schon nicht unerheblich ist, entging der ersten Messung der „Gesamtmenge“ und wird bei der zweiten nicht

¹⁾ Seiffert, Vorrichtung zur qualitativen und quantitativen Gasbestimmung bei gasentwickelnden anaëroben Bakterien. (München. med. Wochenschr. 1907. p. 2285; Ref. nach Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 42. 1909. p. 611.)

mehr beachtet. Denn diese berücksichtigt nur die Menge Wasserstoff, bezw. den Gasrest, welcher zurückbleibt, nachdem der Kohlendioxyd-Anteil durch eingebrachte Stückchen Ätzkali völlig entfernt ist.

Aus der Differenz dieser zweiten Messung mit der ersten ergibt sich das Kohlendioxyd, abzüglich seiner infolge Absorption entgangenen, auch nicht annähernd in Rechnung zu ziehenden Menge. Die Absorption des Wasserstoffs ist hierbei praktisch bedeutungslos. Daher kommt es, daß der Wasserstoff, soweit er von hinabfallenden Agarteilchen eingeschlossen, nicht mitgerissen wird, quantitativ ziemlich genau gefunden wird, wogegen das Kohlendioxyd mit seiner leichten Löslichkeit, durch jede Manipulation nur Verluste erfahrend, das Ergebnis der Gesamtgasmenge, sowie das Verhältnis von Wasserstoff zu Kohlendioxyd stark in Mitleidenschaft zieht. Dieser Fehler läßt sich aber in der soeben nach Burri und Dügge li wiedergegebenen Ausführung nicht vermeiden. Wollte man den Agar mehr als 3-proz. verwenden, so würde er, obwohl wasserärmer, durch seine Konsistenz die Absorption der wie in einem Gummiball unter Druck stehenden Gasbläschen nur begünstigen; ebensowenig würde mit größerem Wasserzusatz bei der Darstellung des Nährbodens erreicht werden. Man mag in dieser Hinsicht vorgehen, wie man will, das durch Messung ermittelte Kohlendioxyd, bezw. das Gesamtgasvolumen bleiben stets hinter ihrer wirklichen Größe zurück. Der Hebel scheint mir anderswo angesetzt werden zu müssen, und ich möchte nicht versäumen, dazu einen Weg zu weisen, wie die sonst recht einfache und bequeme Methode an Brauchbarkeit gewinnen dürfte, ohne jedoch ihre frühere Einfachheit allzusehr zu beeinträchtigen.

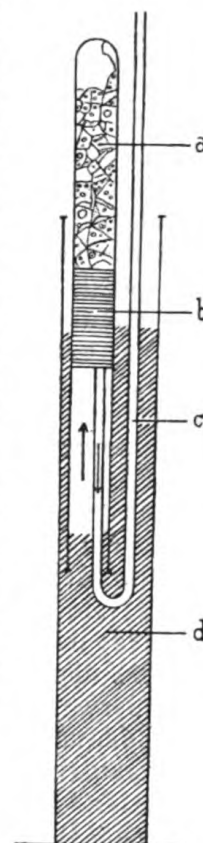
Da der Hauptfehler der Methode durch Absorption der Kohlensäure bedingt wird, so muß bei einer beabsichtigten Verminderung dieser Fehlerquelle dahin gezielt werden, daß in erster Linie die erste Messung genau wird. Ist dies erreicht, so muß auch die zweite, die nur den Wasserstoff berücksichtigt, präzis gemacht werden, d. h. es muß verhindert werden, daß von den hinabfallenden Agarstückchen eingeschlossene Wasserstoffbläschen mitgerissen werden, was sich aber bei dem Zerstückeln des Agars und Anwendung einer Sperrflüssigkeit von geringerem spezifischen Gewicht als dem des Nährbodens nicht vermeiden lassen dürfte. Daraus folgt die Bedingung, daß vor der zweiten Messung kein Gasblasen enthaltendes Agarstückchen das Rohr verlassen darf. Doch wie sollen denn diese Bedingungen erfüllt werden? Es ist nicht möglich, wenn man das Rohr mit Wasser füllt, wohl aber bei Verwendung von Quecksilber als Sperrflüssigkeit. In dem Analysengang brauchte dann nicht viel geändert zu werden. Es scheint jedoch zweckmäßiger, das Zerstückeln des Agars ganz zu unterlassen und ihn, durch Erwärmen zum Schmelzen gebracht, vom Gas zu entbinden und dessen Menge nach dem Erkalten erstmals, nach Absorption des Kohlendioxyds mit Ätzkali zum zweiten Male zu messen. Sollte dieses gelingen, so hätten wir eine nunmehr ziemlich einwandfreie Methode, die sich zu verhältnismäßig leicht und schnell auszuführenden Untersuchungen von Bakteriengasen bei allen bakteriologischen Arbeiten eignen würde.

Die praktische Ausführung gestaltet sich folgendermaßen: Das nach der Art Burri und Dügge li bereitete Rohr wird nach beendeter Gärung oder event. auch zu jeder anderen Zeit, mit nach unten gekehrter Mündung durch Eintauchen in einen mit Quecksilber gefüllten Zylinder mit dem Metall gefüllt, und zwar in der Weise, daß man mittels eines in die Röhre bis unmittelbar unter die Agarschicht eingefügten U-Röhrchens

die Luft durch einfaches Senken des Agarrohres verdrängend, Quecksilber an ihre Stelle treten läßt (Figur). Sodann wird der Agar verflüssigt, jedoch statt durch direktes Erwärmen mit der Flamme, wobei der Agar im Innern nicht zum Schmelzen gebracht werden kann ohne Gefahr, daß die Gärungsgase durch Überhitzen oder teilweise Verkohlung des Agars mit fremden Gasen verunreinigt werden, zweckmäßiger in der Weise, daß die gesamte Apparatur $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampfsterilisationsapparat bei Siedehitze gehalten wird; danach ist der Agar geschmolzen und praktisch gasfrei. Man läßt durch schnelles Abkühlen den Agar erstarren, bringt beide Quecksilberkuppen in gleiche Höhe, somit das über dem Agar stehende Gas unter Atmosphärendruck, mißt den Stand der oberen Agarschicht, auch noch die Temperatur und Barometerhöhe, was stets auch dann geschehen sollte, wenn die Gase nicht auf Normalvolumen gebracht werden, was ja nicht immer nötig ist, zumal man die Messung des Wasserstoffs gleich daran anschließen wird. Zu diesem Zweck durchstößt man die Agarschicht mit einem U-förmigen Glasstab der Länge nach, bringt mit umgebogener Pipette 1 ccm Kalilauge (1 Teil Ätzkali und 2 Teile Wasser, Absorptionswert 40 ccm Kohlendioxyd) unter die Mündung des Agarrohres, wonach das Kohlendioxyd in einigen Minuten vollständig gebunden ist. Der den Wasserstoff darstellende Gasrest kann sogleich gemessen werden. Sollte bei der ersten Messung des Gesamtgasvolumens der erstarrte Agarzylinder nicht leicht beweglich sein, so reißt man ihn durch Heben und Senken der Röhre leicht los.

Ein schwerwiegender Einwand kann gegen dies abgeänderte Verfahren meines Erachtens nicht mehr erhoben werden, obgleich es natürlich nicht ganz fehlerfrei ist. Diese ihm noch anhaftenden, aber zu vernachlässigenden Mängel beruhen auf der Aufnahme von Luft, sowohl vom Nährboden her beim Anlegen der Schüttelkultur, wie vom Deckagar während der Zeit der Bebrütung. Diese Luft wird nach dem Schmelzen des Agars mit frei. Ferner auf der Absorption des Kohlendioxyds der Gesamtgasmenge bis zum Erkalten des Agars vor der ersten Messung, wodurch diese etwas zu klein ausfällt. Praktisch müssen und können wir diese geringen Fehler übersehen. Sie kompensieren sich sogar bis auf einen ganz geringen Verlust an Kohlendioxyd, dessen Absorptionsgröße die der aufgenommenen Luft doch wohl etwas übertreffen dürfte.

Die Vorzüge der modifizierten Methode gegenüber dem Verfahren von Burri und Dügge li treten klar hervor. Sie gründen sich darauf, daß Quecksilber als Sperrflüssigkeit verwendet wird und bestehen darin, daß jetzt erstens die Möglichkeit vorliegt, das absorbierte Kohlendioxyd durch Auskochen auszutreiben, und daß zweitens die Wiederabsorption fast verhindert wird, da der Agar unter stark vermindertem Druck erstarren gelassen werden kann. Es werden ferner Gasverluste, die durch hinabfallenden gashaltigen Agar entstehen, vermieden und es wird schließlich Ätzkali erspart.



- a = Zuckeragar mit Gas.
- b = Deckagar.
- c = U-Röhrchen zum Entweichen der Luft.
- d = Quecksilber.

Sodann erschließt die Verwendung von Quecksilber dieser Methode eine ausgedehntere Anwendbarkeit. Wir sind nicht mehr an Agarnährböden gebunden, wir können nunmehr auch Gelatineböden, selbst für peptonisierende Bakterien, sowie sogar völlig flüssige Nährböden, einfache Peptonlösungen usw. verwenden. Für Gelatine ist das Verfahren genau gleich, es vereinfacht sich jedoch insofern, als der Nährboden schon durch Einstellen in den Brutofen geschmolzen werden kann, was für qualitative Proben genügt. Zu quantitativen Bestimmungen ist jedoch die vollkommenere Art der Gasaustreibung durch Auskochen unerlässlich und dieses muß auch bei bloß qualitativen Proben mit ganz besonderer Sorgfalt geschehen, wenn es sich bei Untersuchungen von pathogenen Bakterien um ihre Vernichtung handelt. Dieser Umstand läßt die Methode von Burri und Duggeli zur quantitativen Untersuchung pathogener Gasbildner ungeeignet, oder aber nur mit hygienischen Bedenken verwendbar erscheinen. Die Möglichkeit, sich eines flüssigen Nährbodens bedienen zu können, ist noch ein Fortschritt, da Flüssigkeiten allen Zellen eher gleichmäßige Bedingungen liefern als es feste Nährböden vermögen, in welchen ganze Komplexe durch lokale Versäuerung frühzeitig absterben müssen.

Es könnte eingewendet werden, daß sich Quecksilber seiner bakteriziden Eigenschaften wegen als Sperrflüssigkeit, namentlich wenn man Bouillon oder Peptonwasser als Nährboden für die Bakterien nimmt, nicht eigne. Das ist nicht der Fall. Quecksilber löst sich in flüssigen Nährböden sehr wenig, und die Gefahr, daß es Bakterien abtöten kann, ist um so geringer, je reiner das Metall ist.

Bei den Untersuchungen in Flüssigkeiten gestaltet sich die Methode nur hinsichtlich der Beschickung der Röhre etwas anders. Man verfährt folgendermaßen: Ein mit Quecksilber gefülltes Rohr wird samt dem einer pneumatischen Wanne entsprechenden Quecksilberzylinder im Dampfstrom sterilisiert. Es wird dann mittels umgebogener, steriler Pipette die gewünschte Menge einer Nährlösung hineingebracht, die vorher mit der zu untersuchenden Bakterienart geimpft wurde; sie sammelt sich sofort oben über dem Quecksilber an. Man kann auch von vornherein die Nährlösung einfüllen und hernach impfen. In jedem Falle muß man jedoch verhindern, daß das sinkende Quecksilber durch die Pipette Luft einsaugt. Es kann das vermieden werden, wenn man die Pipette nicht ganz auslaufen läßt. Man stellt den Zylinder sodann in den Brutschrank. Durch Verstopfen mit Watte verhindert man das Verdampfen von Quecksilber nach Möglichkeit. Bei flüssigen Nährböden muß, bei Agar- und Gelatinekulturen kann man das Rohr mit Quecksilber beschickt, der Gärung unterwerfen. Dadurch wird die Aufnahme von Luft durch den Agar, sowie die Gelatine — Deckschichten sind dabei überflüssig — verhindert und auch jede Gasdiffusion von wie zu dem Nährboden ausgeschlossen. Die Gärung verläuft unter streng einheitlichen Bedingungen.

Je nach der als Kohlenstoffquelle des Nährbodens verwendeten Zuckerart und nach der gewünschten Genauigkeit wird man die Weite und Größe der Kulturröhrchen variieren. Für viele Fälle scheinen die von Ackermann angegebenen Röhrchen zur Gewinnung von Milchserum ausreichend zu sein.

Handelt es sich bei den Gasanalysen eines Versuchs um die Ermittlung von Schwankungen in der quantitativen Zusammensetzung und sollen auch die anderweitigen, nicht gasförmigen Gärprodukte bestimmt werden,

so genügt diese einfache Methode nicht mehr. Für derartige Untersuchungen ist ein nach ähnlichen Prinzipien konstruierter Apparat, der etwa 1 l Nährlösung aufnehmen kann, geeignet. Über diesen werde ich später berichten.

Nachdruck verboten.

The Bacteriology of Cheddar Cheese.

[From the Laboratories of the Wisconsin Experiment Station Madison, Wisconsin, U. S. A.]

By **E. G. Hastings**, Bacteriologist, Wis. Experiment Station, **Alice C. Evans**, Bacteriologist Dairy Division, Bureau of Animal Industry, U. S. Dept. of Agriculture, and **E. B. Hart**, Chemist Wis. Expt. Stat.

Mit 2 Textfiguren.

Introduction.

Ever since microorganisms have been known to be the most important agents in the decomposition of organic matter their role in the preparation and ripening of the various kinds of cheese has attracted the attention of bacteriologists.

The fermentation industries include those in which the changes which the raw material undergoes are due wholly or in part to microorganisms. The preparation of all kinds of cheese involves the use of microorganisms, and hence the manufacture of cheese is to be classed among the fermentation industries. In these industries two factors are of special importance in determining the quality of the finished product — the quality of the raw material and the organisms used to accomplish the desired changes. Thus the quality of beer is influenced by the quality of the barley, the composition of the water, and by the kind of yeast employed. In most of the industrial fermentations the organism concerned is not specific as in the causation of disease, but can be replaced by another producing, in the main, the same change in the raw material, but yet influencing the quality of the product because the same by-products are not formed, or at least are not formed in the same relative proportion. So in the production of cheese, as is well known, the quality is dependent on that of the milk and on the kinds of bacteria which are present or are added to the same.

In many industrial fermentations a single form of life is concerned. These fermentations present a comparatively simple problem to the biochemist, as compared with those in which several kinds of microorganisms are concerned. It is evident that the complex chemical changes which the proteins and carbohydrates of cheese curd undergo cannot be due to a single form of life, but that more probably a number are involved. The biological agents involved in the changes that result in cheese with far different flavors and textures from the same raw materials, milk, salt, and rennet, have been studied by many microbiologists during the last three decades. For most kinds of cheese the problems are not completely solved. The following data are presented as a step in the solution of the biology of the English and American cheddar cheese.

Flora of Milk.

The methods of manufacture of the various kinds of cheese have been developed in a wholly empirical manner. Even in the case of cheese to which, at some stage in manufacture, material containing certain microorganisms is added, the methods of manufacture antedate the science of bacteriology.

The sources from which microorganisms enter the milk are everywhere the same; — the interior of the udder, the dust from the animal, and the utensils always furnish certain definite types of microorganisms. That this is true is shown by the fact that any sample of market milk stored at any given temperature will undergo a definite sequence of decomposition changes with almost unerring certainty. Thus it is proper to speak of a characteristic milk flora. By some it is believed that this flora is so constant that fermentations that depart from the normal are to be looked upon, not as due to the introduction of other forms of microorganisms, but most often to changes in the properties of the organisms or to changes in environment that favor the particular organisms which produce the abnormal fermentation. Slight changes in the composition of the milk may have a determining influence. If the flora of milk were not practically a constant factor in that certain kinds of microorganisms are always present, the empirical methods of cheese manufacture could never have been developed.

The microorganisms necessary for the preparation of most kinds of cheese are contained in the milk. Whether one form of organism or another is to develop in the cheese depends upon the environment established by the cheesemaker. The manufacture of cheese is thus a problem in the ecology of microorganisms.

Differences in Composition of Cheese.

Variations in the methods of manufacture result in differences in composition of the unripened cheese. Before beginning to ripen, various kinds of cheese differ largely in the amount of whey which they contain. The difference in moisture content between cheddar and camembert cheese is approximately 25 per cent. If it is supposed that the moisture of the cheese will have about the same sugar content as milk, this means that the sugar content of camembert cheese will be about 1 per cent greater than cheddar, and, since the sugar is all to be fermented, variations in sugar content ultimately result in differences in acidity.

Van Slyke and Hart¹⁾, Boekhout and de Vries²⁾ and Van Dam³⁾ have shown that acid is held chemically by the proteins of cheese curd, while sugar is not. Thus, if in the making of one cheese acid is formed, and in another not formed, the result will be a somewhat different composition, even though the moisture content of the two cheese is initially the same.

Another difference in composition of cheese is caused by variations in amount of salt and the time at which it is added. This difference is an important one in the case of cheddar and Emmental cheese. These differences in the initial composition are sufficient to exert a great influence on the types of life that are to grow in and on the cheese.

¹⁾ N. Y. Geneva Sta. Bull. 214. 1902. p. 60.

²⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 24. p. 122.

³⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 7.

The role of the inherent enzymes of milk and those of the rennet extract in the ripening of cheese have been emphasized by the work of Babcock and Russell, and von Freudenreich and Jensen. There remains no doubt concerning the importance of certain enzymes, especially those of rennet extract in the ripening of cheese. The enzymic content of all cheese must be the same qualitatively, since they are made from the same raw materials. Again it is difficult to see how one enzyme can be active in one cheese and not in other kinds. Accepting the theory of the specificity of enzymes, it must be admitted that the products of the activity of any enzyme will be the same in kind no matter what the conditions under which it may be working. Hence it does not seem that the enzymes of milk or rennet can be factors determining the kind of cheese to be made by any method from the ordinary raw materials, but that the determining factors must be biological.

The Biological Problem.

The empirical methods of the practical cheesemaker result in an environment that favors the development of certain of the organisms present in the milk. The problem of the microbiologist is to demonstrate the presence of the essential groups of microorganisms, and, if possible, to determine the sequence of their development.

Thom has shown in the case of camembert cheese that lactic bacteria, the camembert mold (*Penicillium camemberti*) or the white form (*Penicillium camemberti* variety *rogeri*), *Oidium lactis*, and possibly still other forms of bacteria are necessary agents in the ripening of this cheese. He has also shown that there must be a certain relation existing between the molds as far as luxuriance of growth is concerned. If through variations in manufacture, or conditions of ripening, this essential relation is destroyed the cheese will not be a typical camembert.

Many classes of microorganisms are found in all milks. These same forms will necessarily be present in the cheese. They may even persist therein for a long period, but no growth may occur. It is evident that no organism can be a factor in the ripening of any cheese unless growth occurs in the cheese, hence it is necessary to establish, not only the constant presence, but also to prove that growth has taken place, before one can conclude that any particular organism is an essential agent in the ripening of the cheese studied. Duclaux in his studies on Cantal cheese employed methods that were especially favorable for the development of the liquefying, spore-forming bacteria that are constantly to be found in all cheese. Their constant presence, together with the fact that they produced in pure culture in milk, compounds which he had already demonstrated in the ripe cheese, led him to consider them an important factor in the ripening of this cheese. It has been demonstrated since, that the conditions in hard cheese do not permit this class of bacteria to develop and hence they can not be essential ripening agents.

Bacteriological Methods.

The modern bacteriological methods will not demonstrate the presence of all kinds of bacteria in milk, cheese or any other substance in which a considerable number of kinds are present, even though all may find conditions that will permit growth on the medium employed. It is usually

easy to demonstrate the presence of the form that occurs in greatest numbers, since in the more lightly inoculated culture plates this form will be present in pure culture, or else so freed from competition with the other forms that its growth will not be prevented. For those forms present in less numbers, this condition does not obtain, and special methods must usually be employed to demonstrate their presence, such as the use of differentiating media or enrichment cultures. Any one who has experience in plating milk on lactose media has noted that in certain cases the plates thickly seeded, show colonies of but a single organism, usually the ordinary *Bact. lactis acidii*, while on the more thinly seeded plates from the same sample, other forms may appear. In the thickly seeded plates, the lactic organisms, on account of favorable conditions, grow most rapidly and, by the acid produced, prevent the development of other forms. In the more thinly seeded plates, the colonies are separated by such a distance that the products of one colony do not reach the others; each colony then grows as though it were the only colony on the plate. Hence forms appear on thinly seeded plates that do not on those crowded with colonies. If the organism that finds most favorable conditions greatly exceeds in numbers some other form, the latter may never appear on the culture, or be so inconstant as not to attract the attention of the bacteriologist. A ratio of 1,000 to 1 or even 500 to 1 may prevent the detection by use of the ordinary plate culture methods of the organisms present in smaller numbers.

These facts may serve to explain the results obtained by previous investigators of cheddar cheese.

***Bacterium lactis acidii* Group in Cheddar Cheese.**

The first detailed work on cheddar cheese with which the writers are acquainted is that of Russell¹⁾, whose work was largely concerned with a quantitative examination of cheddar cheese during the ripening process by means of gelatin plates. It established the fact that acid-forming organisms, *Bact. lactis acidii*, make up 99 per cent and over of the bacteria thus determined. The work of Lloyd on English cheddar cheese led to similar results.

The most extensive work on the bacterial flora of cheddar cheese is that of Harding and Prucha²⁾, who isolated the different types of organisms appearing on cultures made from nine normal cheddar cheese during the entire period of ripening. The more than 300 cultures isolated were studied in detail and thus reduced to thirty-three groups. The *Bact. lactis acidii* group was the only one which was constantly found, and it nearly always included over 99 per cent of the total germ content. The remaining ten groups which these investigators classed as important on account of frequency of occurrence, were not found in all of the cheese, and it may be inferred that they do not represent essential factors in the ripening of cheddar cheese.

The work of previous investigators has shown that the liquefying, the gas-forming, the inert bacteria, and yeasts are not essential factors in the ripening of cheddar cheese, since all or any one of the groups may be absent and yet the cheese may ripen in a normal manner. It is true that all of these

¹⁾ Wis. Expt. Sta. 13 th Ann. Rept. 1896. p. 95.

²⁾ N. Y. Geneva Sta. Tech. Bull. 8. 1908.

groups are usually represented in cheddar cheese, since they are present in milk, but the numbers are small and in the case of the liquefying organisms there is no evidence that growth ever occurs during the ripening process.

The work of previous investigators may be summarized in the statement that the group of bacteria represented by *Bact. lactis acidi* is the only one that has been shown to be of constant occurrence in cheddar cheese. This fact together with the enormous numbers, amounting to millions and at times over a billion per gram of the fresh cheese, leaves no doubt of the importance of this group of organisms in cheddar cheese, and undoubtedly in all cheese that undergo a ripening process.

Roles of *Bacterium lactis acidi* in the making of Cheddar Cheese.

The cheddar maker desires milk that has just passed through the "period of incubation". By this expression is meant the time during which no apparent increase in acidity results from the growth of the acid-forming bacteria. This has been supposed to be due to the fact that no acid was formed by the rapidly growing organisms. More recently it has been pointed out by *Rahn*¹⁾ that this is not the true explanation but that until the bacteria have increased to a great extent, the amount of acid formed is so small as to escape detection. At last the acidity begins to develop with increasing rapidity until it reaches a point where it exerts an inhibitive effect upon the growth of the organism. In Table I are given some data illustrating the rate of acid development in milk kept at 95° F. It will be noted in both samples that the initial rate of increase in acid is small, that it reaches a maximum that may be over 0.15 per cent per hour, and then declines. Both samples of milk were slightly too acid for cheesemaking.

Table I.
Rate of Development of acid in Milk kept at 95° F.

	Hours	0	1	2	3	5	24
Sample 1	Per cent acidity	0.24	0.30	0.40	0.47	0.71	1.00
	Per cent increase per hr. .	—	0.06	0.10	0.07	0.12	0.015
Sample 2	Per cent acidity	0.20	0.24	0.34	0.50	0.74	0.99
	Per cent increase per hr. .	—	0.04	0.10	0.16	0.12	0.012

This rapid increase in acidity is the result of the growth of the acid-forming bacteria in the favorable environment. In Table II are given the results of the bacteriological examination of two samples of milk kept at 95° F. for a number of hours. It will be noted that increase in numbers of

Table II.
Increase of Bacteria in Milk kept at 95° F.
Number of bacteria per c. c. expressed in millions.

Hours	0	2	4	6	8	10
Sample 1	59	83	231	927	1,064	1,167
Sample 2	4	—	157	826	1,545	1,982

¹⁾ Science. 33. p. 539.

bacteria like that of acidity goes on with increasing rapidity until a maximum is reached, after which the growth is less and less rapid.

The solid bodies present in the milk will be held by the curd in the same manner as the formation of aluminum or ferric hydrate in water enmeshes the solid bodies present, or the coagulating of albumen in a solution removes turbidity as in the clearing of bacteriological media, wine, etc.

Table III.
Bacteria in Milk and in Whey immediately after curdling.

Trial No.		1	2	3	4	5	6
Thousands of bacteria per c. c.	Milk	128,000	11,000	2,050	155,000	23,000	59,000
	Whey	34,000	2,900	730	756	773	776

In order to illustrate the effect of curdling on the distribution of bacteria, several samples of milk were subjected to a quantitative examination. Rennet solution was then added, and the curd cut. As soon as possible, a sample of the whey was likewise examined. In Table III are given the data obtained from a number of such examinations. It will be noted that in all cases the whey contained less bacteria than the milk before curdling. From the average figures of the determinations approximately 77 per cent of the bacteria were retained in the curd.

Formation of Acid in Curd.

The result of curdling and the shrinking of the curd is that the bacteria of the milk are concentrated in the curd which soon after cutting occupies but a fraction of the volume of the original milk. This concentration together with the environment favorable to *Bact. lactis acidi* results in a rapid formation of acid in the curd. This condition should result in a more rapid increase of acid in a whey in which the curd is allowed to remain than in a portion of the same whey removed from the curd. As the curd shrinks, the expelled whey should bring with it a portion of the acid that has been formed in the curd; this together with osmotic action should increase the acidity of the whey in contact with the curd. In order to demonstrate this, a sample of milk was curdled, the curd cut, and as soon as pos-

Table IV.
Development of acid in Whey alone and in contact with the Curd.

Trial	Hours	0	2	4	6	8	10	12
		%	%	%	%	%	%	%
1	Whey	0.09	0.09	0.10	0.13	0.16	0.24	0.36
	Whey and curd	0.09	0.10	0.16	0.17	0.32	0.47	0.54
2	Whey	0.14	0.20	0.30	0.35	0.49	—	—
	Whey and curd	0.14	0.27	0.48	0.53	0.68	—	—
3	Whey	0.10	0.12	0.12	0.22	0.33	—	—
	Whey and curd	0.10	0.12	0.16	0.32	0.49	—	—
4	Whey	0.09	0.10	0.11	0.13	0.14	0.33	—
	Whey and curd	0.09	0.10	0.13	0.18	0.20	0.42	—

sible a portion of the whey removed to a separate vessel. Acidity determinations were made at intervals, the results are given in Table IV. It will be noted that in every case the acidity of the whey in contact with the curd increased much more rapidly than did that not allowed to remain in contact with the curd.

It has been shown that paracasein will absorb acids. It is probable that it will also combine with acids. In either case a portion of the acid formed in the curd should be retained in loose chemical combination and the acidity of a sample of milk should increase more rapidly than that of the whey from the same milk even though the whey is in contact with the curd.

The data given in Table V show this to be true. The figures represent the increase in acid at the end of each period over the initial acidity of the milk or whey and curd. This leaves no doubt that a portion of the acid is retained by the curd. It is thus shown that a cheese in which acid is developed during the making process will have a different acidity from one with an equal content of moisture, but in which no acid is formed during the making.

Table V.
Increase in acidity of Milk and of Whey in contact with Curd.
Per cent increase over initial acidity.

Trial	Hours	2	4	6	8	10	12
1	Milk	% 0.19	% 0.34	% 0.64	% 0.73	% —	% —
	Whey and curd	0.13	0.32	0.38	0.52	—	—
2	Milk	0.00	0.01	0.09	0.32	0.55	0.74
	Whey and curd	0.00	0.01	0.02	0.05	0.18	0.26
3	Milk	0.04	0.21	0.44	0.69	—	—
	Whey and curd	0.05	0.11	0.16	0.28	—	—
4	Milk	0.03	0.15	0.43	0.63	—	—
	Whey and curd	0.03	0.04	0.16	0.25	—	—

The use of ripened milk or that which has just completed the period of incubation insures the presence of immense numbers of acid-forming bacteria in the milk. While the quantity of acid formed during the period is so small as to escape detection by titration it has a marked influence in hastening the curdling of the milk by rennet.

As has been shown, the larger part of the bacteria are retained in the curd where growth is rapid because of the favorable environment. Large quantities of acid are formed, as is shown by the fact that the whey coming from the curd at the time it is placed in the press has an acidity of 0.8 to 1.0 per cent.

It has been shown that the expulsion of whey from the curd is directly proportional to the amount of acid present, at least in the case of per cents of acid that are met in normal cheese curds. The growth of lactic acid bacteria in the curd and the consequent development of acidity are necessary to secure a curd with the proper moisture content.

The action of acid on paracasein results in the formation of a compound so plastic in nature that the particles of curd undergo fusion under the influence of the pressure applied in the press, so that the cheese become a single

unit free from mechanical holes. In the absence of acid-formation such a fusion does not occur.

Roles of *Bact. lactis acidii* in the Ripening of Cheddar Cheese.

In the ripening process proper, the acid resulting from the fermentation of the sugar by the organisms of the *Bact. lactis acidii* groups has an important role. As has been shown by numerous investigators, the sugar in the cheese is all fermented within a few days. It has been shown by Babcock and Russell¹⁾ and Jensen²⁾ and Van Slyke, Harding, and Hart³⁾ that rennet extract has not only a curdling effect but has a digestive action in the presence of an activating acid such as is present in the cheese. The rapid proteolysis occurring during the first part of the ripening process is largely due to the action of the pepsin. Variations in the amount of rennet extract added to the milk result in differences in rate of ripening, as has been shown by numerous investigators. This can be explained only through the variations in the pepsin content of the cheese.

It would thus seem that if a cheese were made from milk that contained but few acid-forming organisms, the rate of ripening would be delayed. In order to test this hypothesis, a cheese was made from very clean milk, containing scarcely any acid-producing organisms. No acid whatever was formed during the making process. In order to follow the rate of acid formation, determinations of the sugar and acid present in the cheese were made at intervals. The results are given in Table VI.

Table VI.
Sugar content of Cheese made from Milk containing
few Lactic Bacteria.

Days	Per cent sugar	Per cent acidity
1	1.51	0.25
2	1.49	0.27
4	1.48	0.27
8	1.45	0.27
22	0.94	0.45
46	0.00	1.13

In a normal cheese the sugar disappears in three to five days, while in the experimental cheese over one-half of the sugar remained on the twenty-second day. The maximum bacterial content was not attained, as measured by the ordinary plate cultures, until after the sixth week. The rate of ripening as measured by the change in texture and development of flavor was correspondingly slow. At three months, the cheese still showed a spongy texture and scarcely any cheese flavor.

Protective Action of Acid.

The putrefactive bacteria that are constantly present in milk, and hence in cheese, are unable to grow on account of the acid reaction which is maintained during the entire period of ripening. This protective action of acid

¹⁾ Wis. Expt. Sta., 17th Ann. Rept. 1900. p. 102.

²⁾ Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1900.

³⁾ N. Y. Geneva Sta. Bull. 233. 1903.

was first demonstrated at the Wisconsin Experiment Station by Babcock and Russell¹⁾ who removed the sugar from curd by washing in water. The cheese developed most undesirable odors and tastes, and bacteriological examinations showed liquefying bacteria to be numerous. If lactose, glucose, or cane sugar were added to the washed curd, the ripening process was much more nearly normal because the acid reaction was thereby restored, due to the fermentation of the added sugar, and the putrefactive organisms were inhibited as in a normal cheese. In our experimental work on flavor development in cheddar cheese, a number of cheese have been prepared from curd from which the sugar was removed by washing. In Figure 1 a normal and a washed curd cheese are illustrated. The washed curd cheese was devoid of texture, being a soft plastic mass and having no resemblance to cheese in odor and taste.

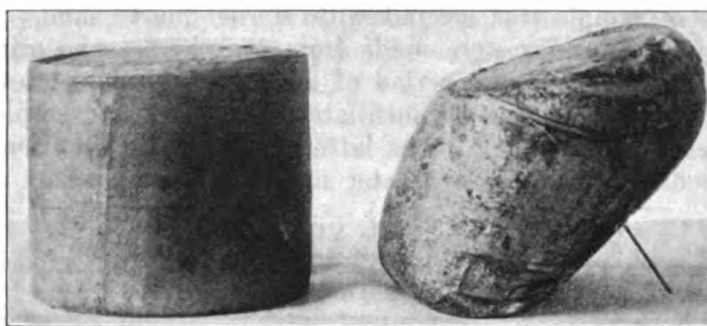


Fig. 1. A normal cheddar cheese and one prepared from a curd washed free from sugar. In the normal cheese the putrefactive bacteria were unable to grow; in the washed curd they acted on the curd until it became so soft that the cheese did not retain its form.

The roles of the organisms of the *Bact. lactis acidi* group in cheddar cheese may be summarized as follows:

1. They favor the curdling process.
2. They favor the expulsion of the whey.
3. They permit the fusing of the curd particles.
4. They activate the pepsin of the rennet extract.
5. They have a protective action against the putrefactive bacteria.

As has been stated, the sugar in the cheese is completely fermented within a few days. It is not probable that growth of *Bact. lactis acidi* continues after this period. The results of numerous investigators have shown that the maximum numbers of this group of bacteria are found when the cheese is a few days old, and that thereafter the decrease in numbers is usually rapid. It is not believed that these organisms can exert any marked action in other lines than have been mentioned after growth ceases.

The ripening process continues long after this period. A large amount of data has been collected that shows that the nitrogenous portion of the cheese is constantly changing. Comparatively recently it has been shown by Hart, Hastings and Suzuki that the non-nitrogenous portion is also constantly changing. The content in volatile fatty acids, and the relative amounts of these varies as the ripening period progresses. These

¹⁾ Wis. Expt. Sta. 18th Ann. Rept. 1901. p. 162.

changes must be due either to enzymes elaborated by the *Bact. lactis acidii* group that is present in great numbers early in the ripening period or to other groups of bacteria that develop later and which have escaped the attention of previous investigators of cheddar cheese, or to both of these factors.

The Rate of Bacterial Growth in Cheese.

In the course of the cooperative work carried on by the Dairy Division of the United States Department of Agriculture and the Wisconsin Experiment Station a large number of cheese have been examined bacteriologically. Some were examined at frequent intervals during the making process and during the first portion of the ripening period. Other cheese were examined at less frequent intervals during the entire period of ripening.

Method of Examination.

The cheese sample was ground with sterile quartz sand, and inoculations in varying dilutions were made from the cheese suspension into lactose-agar plates. At first the period of incubation of the plates was forty-eight hours at 37° C. Later the incubation at 37° C. was supplemented by a further incubation at 20° C. The latter method of incubation was found to allow the development of a greater number of organisms.

Table VII.

Numbers of Bacteria Per Gram of Cheddar Cheese, Expressed in Millions of Bacteria Per Gram.

Cheese No.	Milk	Curd at Salting Time	Days						
			1	2	4	7	13	22	29
582	0.7	912	709	848	522	853	369	348	314
583	0.5	839	569	580	1025	184	401	319	144
474		58	1657	987	325	407	141		
477		53	1925	2171	1916	221	598		
54							32		15
92				250		400	500	35	
Days									
36	47	56	70	99	113	124	143	155	187
326	436		193	45					
504	661		168	55					
		32	51	8.5		14	22.5		6
	340	225		120	87	96	38	32	2

Results of Work.

The data collected by the use of the plate method confirm the work of earlier investigators and emphasize the number of organisms of the *Bact. lactis acidii* group that is to be found during the early part of the ripening period. A portion of the data collected is presented in Table VII. It

gives a picture of the bacterial development during the making of the cheese and in the few days thereafter, and also of the gradual slow decline in bacterial numbers.

The maximum number of bacteria as measured by the lactose agar plate cultures occurs early in the ripening process. Those cheese which were examined frequently during the first few days showed a maximum number of bacteria within forty-eight hours. All of the cheese showed a maximum number early in the ripening period. These results are similar to those obtained by Harding and Prucha¹⁾.

It is impossible to determine the time at which the growth of any particular type of organism in cheese ceases. As the fermentation in the cheese progresses and the accumulation of by-products increases cell death begins. As long as the process of cell division is more rapid than the death of the cells, an increase in living bacteria will be shown by the plate cultures. Soon, however, a weakening of the cells takes place, which makes them unable to grow upon the solid media, and finally death occurs. When these changes take place more rapidly than cell division, the decrease in apparent numbers begins, although growth may continue for a much longer period. In milk cessation of growth of the *Bact. lactis acidi* group of bacteria is due to the appearance of free acid; in cheese to the disappearance of an essential food, lactose.

The large numbers of bacteria found during the first days are striking; the number as given in the tables is far below the actual number of cells present in the cheese, due to the impossibility of breaking up the colonies of bacteria in the tough cheese. It is probable that the germ content of fresh cheese often amounts to hundreds of billions of living bacteria in each gram of the moist cheese.

We have determined the number of cells in a gram of the moist growth of a coccus found in cheese by suspending one gram in a known amount of water and by shaking until the suspension was very uniform. One volume of this suspension was mixed with one volume of normal human blood. Smear preparations were made from this mixture and the number of bacteria and of red blood corpuscles occurring in a considerable number of microscopic fields counted. Since the number of blood corpuscles is practically a constant quantity in normal blood, one can thus determine the volume of blood contained in the microscopic fields counted. The bacterial suspension in which the bacteria have been counted represents an equal volume so one has the data to calculate the number of cells in the total suspension or in the one gram of growth. The average figure obtained was 1.150 billion cells in one gram of growth.

MacNeal²⁾ found 5,300 billion *B. coli* in a gram of the dry growth. If the moisture content of the moist growth of *B. coli* be taken to be 90 per cent, the number of cells in one gram of moist growth would be 530 billion. The volume of the coccus employed by us was 0.5236 cubic microns, of *B. coli* 1.13 cubic microns. It is thus evident that the agreement between our results and those of MacNeal is very close.

From the statements just made it is evident that during the first portion of the ripening period from 0.1 to 1 per cent of the weight of the cheese

¹⁾ N. Y. Geneva Sta. Tech. Bull. 8. 1908.

²⁾ Journ. of infect. Dis. 6. p. 123.

consists of bacterial growth. It is probable that in some cases it may exceed 1 per cent.

The results of the analyses of the six cheese given in Table VII emphasize the fact that as far as numbers of bacteria are concerned each cheese has a history of its own. Cheese No. 54 was included in the table to illustrate a cheese with a low germ content. At no time did it show more than a few million bacteria per gram, whereas the other cheese given in the table had a consistently high germ content. In every cheese the period of maximum numbers is followed by a more or less rapid decline. At the time the cheese is ripe there are usually present millions of living lactic bacteria in each gram of cheese. Living lactic organisms have been found by one of the authors in a cheese over four years old.

The ripening of cheese, both in reference to proteolysis and flavor development continues unretarded during the period of decline of the lactic bacteria.

Both the nitrogenous and non-nitrogenous portions of the cheese are constantly undergoing change. Since our work with the usual methods gave no additional information over that secured by previous investigation, it was decided to adopt other methods.

As was previously stated, two factors may be operative after the cessation of growth of *Bact. lactis acidii*, the enzymes formed by the mass of cells, or hitherto unknown groups of bacteria may develop later. Our attention has been directed to both of these factors.

Enzymic Action of *Bact. lactis acidii*.

So far as the writers are aware, no enzyme acting on proteins or on carbohydrates has been demonstrated in this group of organisms. Buchner, Herzog, and others who have shown the presence of acid-forming enzymes in lactic acid-forming bacteria worked with a different group of organisms.

On account of the meagerness of the growth of *Bact. lactis acidii* on artificial media, it was impossible to use the methods employed by Buchner, etc.

It had been noted that when a sample of sterilized milk in which *Bact. lactis acidii* had developed was treated with a preservative such as chloroform or toluol the cells of the bacteria soon disappeared, or at least could no longer be detected by microscopic examination.

It was thought that if the cells would undergo disintegration after having been killed by an antiseptic while in an actively growing condition any enzymes should exert their peculiar action as well as though the cells were mechanically ruptured.

In order to destroy the inherent enzymes of the milk, fresh milk was heated to 97° C. for a short time. The heated milk was inoculated with a pure culture of *Bact. lactis acidii*. At varying periods after the inoculation samples were removed, placed in bottles, 3 per cent toluol added, and the bottles stoppered. In the case of the samples first removed the number of bacterial cells was small, in the later samples much greater. If any enzymic action occurred, the various bottles should show a quantitative difference corresponding to the mass of bacterial growth present at the time of adding the antiseptic.

In order to determine the length of time living cells persisted in the treated milk, tubes of sterile milk were heavily inoculated from the different bottles one, three, and five days after the antiseptic was added. The results are given in Table VIII.

Table VIII.
Action of 3 per cent Toluol on *Bact. lactis acidii* in milk.

Bottle	Tube	1 day	3 days	5 days
1	1	—	—	—
	2	—	—	—
2	1	+	+	—
	2	—	+	—
3	1	—	—	—
	2	—	—	—
4	1	—	—	—
	2	—	—	—
5	1	+	—	—
	2	+	—	—
6	1	+	—	—
	2	+	—	—
7	1	—	+	—
	2	—	—	—

+ = growth; — = no growth.

It is evident from the results that no growth could have occurred after the addition of the antiseptic, and that any increase in the acidity must have been due to the enzymes of the organism.

A microscopical examination was made of the various bottles at intervals. After 74 days but few cells could be found, and they were more or less distorted in form. Acidity determinations were made at varying intervals. The results are given in Table IX.

Table IX.
Increase in Acidity of Milk containing dead cells of *Bact. lactis acidii*.

Bottle No.		Initial acidity	Days incubated						
			1	13	28	59	90	121	150
1	% acidity	.184	.180	.175	.197	.212	.243	.262	.267
	% increase	—	-.004	-.009	.013	.028	.059	.078	.083
2	% acidity	.203	.206	.202	.225	.258	.270	.276	.276
	% increase	—	.003	-.001	.022	.055	.067	.073	.073
3	% acidity	.256	.285	.317	.331	.338	.354	.363	.372
	% increase	—	.029	.061	.075	.082	.098	.107	.116
4	% acidity	.308	.356	.368	.395	.394	.423	.432	.451
	% increase	—	.048	.060	.087	.086	.115	.124	.143
5	% acidity	.349	.427	.423	.460	.428	.492	.540	.543
	% increase	—	.078	.074	.111	.079	.143	.191	.194
6	% acidity	.410	.460	.450	.460	.497	.515	.561	.672
	% increase	—	.050	.050	.050	.087	.105	.151	.262
7	% acidity	.456	.494	.519	.552	.528	.599	.680	.708
	% increase	—	.038	.063	.096	.072	.143	.224	.252

The initial acidity is an index of the number of bacteria present at the time the antiseptic was added. It is to be noted from the data that the increase in acidity is proportional to the number of cells originally present in the bottle. This is more apparent from the data given in Table X, in which the average daily rate of increase for the entire incubation period, 150 days, is given.

Table X.
Daily Increase in Acidity in Milk containing Dead Cells of *Bact. lactis acid.*

Bottle No.	Per cent Increase in Acidity
1	0.0005
2	0.0005
3	0.0007
4	0.0010
5	0.0013
6	0.0017
7	0.0017

It is clear from the data given that there is present in the cells of *Bact. lactis acid.* an enzyme that acts on some constituent of the milk, causing an increase in acidity. It is probable that the lactose is the compound acted on, although this cannot be affirmed from our data.

It is true that the lactose disappears from cheese within a few days and hence the conditions in the cheese differ from those in the bottles of milk, but it may be inferred that other kinds of intracellular enzymes are present in the cells of this organism. As has been shown, a considerable part of the cheese consists of bacteria. The cells slowly disintegrate and their intracellular products are set free. It is not at all improbable that these products are the causal agents of changes that occur in the cheese and that the roles of the lactic bacteria are not limited to those previously mentioned.

Other Groups of Bacteria in Cheddar Cheese.

Attempts have also been made to determine whether other kinds of bacteria than *Bact. lactis acid.* develop in cheddar cheese to any extent and are to be found in all cheese. In a previous publication Hastings and Hamner¹⁾ have given data concerning the distribution of a group of rod-shaped lactic bacteria in milk and other dairy products. This group includes the organisms found in many fermented milks, the *B. Bulgaricus* group; the *B. casei* group to which the work of Freudenreich and Jensen has attracted attention; and many of the acidophilous organisms found especially in the alimentary tracts of animals. These organisms were found to be constantly present in milk, butter, and in all the samples of cheddar cheese examined. . . No quantitative analyses of cheese were made, however, in the work to which reference has been made.

Freudenreich's work showed the constant presence in large numbers of the lactic bacilli in Emmental cheese. In the making of this cheese, they are added to the milk in great numbers in the natural whey

¹⁾ Wis. Expt. Sta. Res. Bull. 6. 1909. p. 197.

rennet employed; the high temperature of the curd during the pressing of the cheese favors their development. These organisms find a more favorable condition for growth in milk than in any of the usual media, indeed some of the members of the group cannot be cultivated except in milk. With the idea of determining the number of the organisms of this group in cheese, inoculation in varying dilutions were made from cheese emulsions into flasks of sterile milk which were protected from evaporation by tin foil caps and incubated at 37° C. The dilutions increased by a ratio of ten. The extent to which the dilutions were carried depended on the age of the cheese. An attempt was constantly made to carry the dilutions to a point, where some of the flasks would remain sterile. The method is thus a quantitative one for bacteria that will grow under the conditions obtaining. The dilution method is to be considered a rough way of determining the number of certain classes of bacteria.

A comparison of the number of bacteria as determined by lactose agar plates and by the dilution culture in milk was made in the case of a number of cheese. In thirty out of the forty-nine comparisons made the dilution method gave the higher results. From this fact it is clear that there are present in the cheese kinds of bacteria that do not find favorable conditions for growth on the lactose agar.

In order to determine the kind of bacteria present in the flasks of milk inoculated from the cheese the acidity of each flask was determined after an incubation at 37° C. for thirty days and when this did not give definite information a microscopical examination was also made.

The *Bact. lactis acidi* group of organisms produce in average milk an acidity ranging from 0.7 to 1.25 per cent. The lactic bacilli produce an acidity usually exceeding 1.25 per cent. It has been the practice, to infer that every flask of milk showing an acidity above 1.25 per cent after one month's incubation contains the lactic bacilli, either in pure culture or mixed with organisms of the *Bact. lactis acidi* group. In the flasks showing an acidity less than 1.25 per cent it cannot be inferred that the lactic bacilli are absent, since some cultures are found that produce no more acid than *Bact. lactis acidi*. Many microscopical examinations were made of the flasks to establish the accuracy of the conclusions drawn from the data obtained by titrations. Microscopic examinations were also made of all the flasks from which the titrations did not give conclusive evidence concerning the organisms present. The smears were stained with Gram's stain and decolorized with a mixture of one part of anilin oil and two parts of xylol. This method of decolorizing removes the stain from the casein, but not from any of the organisms that have been found in cheese.

The dilution method thus gives information concerning the absolute and relative number of acid-forming bacteria of these two groups. It may also give information concerning the presence of still other types of bacteria, when they are present in greater numbers than those of the groups already referred to, since they will then appear in the flasks in pure culture.

The data thus obtained from a number of cheese are given in Table XI.

In order to make the comparison more easy, the same data and also that obtained in the case of some other cheese are given in Table XII.

It will be noted from the data presented in Table XII that during the early part of the ripening period the organisms of the *Bact. lactis*

a cidi group make up over 90 per cent and in many cases approximately 100 per cent of the acid-producing flora of the cheese. With increasing age the ratio changes until late in the ripening period the rod-shaped lactic bacilli predominate and in many cases make up over 90 per cent of the acid-forming bacteria found in the cheese.

Table XI.
Bacterium lactis acidi and acid-producing bacilli determined in milk cultures.
 Expressed in millions of bacteria per gram.

Age in days	Cheese No. 1		Cheese No. 54		Cheese No. 85		Cheese No. 91		Cheese No. 96	
	Bact. <i>lactis</i> <i>acidi</i>	Acid- pro- ducing bacilli	Bact. <i>lactis</i> <i>acidi</i>	Acid- pro- ducing bacilli	Bact. <i>lactis</i> <i>acidi</i>	Acid- pro- ducing bacilli	Bact. <i>lactis</i> <i>acidi</i>	Acid- pro- ducing bacilli	Bact. <i>lactis</i> <i>acidi</i>	Acid- pro- ducing bacilli
2	—	—	—	—	—	—	1,000	—	1,000	—
4	10	1	—	—	1,000	—	10,000	10	100	—
8	—	—	—	—	—	—	1,000	100	1,000	—
11	10	1	—	—	1,000	10	100	—	100	—
14	—	—	1,000	10	1	10	10,000	1	10,000	1
22	1,000	1,000	—	—	—	—	1,000	100	1,000	1
30	100	100	10	—	10	10	—	—	—	—
37	—	—	10	10	100	1	1,000	100	100	10
45	10	10	—	—	10	100	100	100	1,000	1
56	—	—	10	1	1,000	10	100	100	100	10
77	—	—	100	1	100	1	—	—	100	1
86	1	10	—	—	—	10	100	100	100	10
100	—	—	10	1	10	10	100	100	100	10
113	—	1	—	—	10	10	100	10	100	10
124	—	—	10	1	10	10	100	10	100	1
143	10	10	100	10	—	10	100	10	100	1
155	—	—	—	—	10	1,000	10	10	10	10
165	—	—	—	1	—	—	100	100	—	10
176	1	1	—	—	1	100	—	—	—	—
187	—	—	1	1	10	10	—	10	—	10
208	—	10	—	100	—	—	—	—	—	—

The great delicacy of the dilution method as a means of detecting the lactic bacilli in the presence of *Bact. lactis acidi* is shown in the results given in Table XII. On the examination of cheese 91 at fourteen days the per cent of *Bact. lactis acidi* is given as 99.99, that of the lactic bacilli as 0.01. Thus the presence of lactic bacilli was detected in cheese containing 10,000 times as many *Bact. lactis acidi*. In the examination of other cheese the presence of lactic bacilli was shown when they were present with *Bact. lactis acidi* in the ratio of 1 : 1,000,000.

It must not be inferred that the figures given in the table, representing the results obtained by the dilution method, indicate the exact number of the different groups of lactic organisms, or the exact ratio existing between them. The sudden increase or decrease of the ratio is due to the inherent errors of the dilution method.

Since some of the lactic bacilli develop on lactose agar plates, it was thought that if all of the colonies on a certain portion of each plate were inoculated into milk, one should obtain information concerning the sequence

Table XII.
Relative Proportion of Bacterium lactis acidii and lactic acid producing bacilli.
Determined by dilution cultures in milk.

Age in days	Cheese No. 1	Cheese No. 54	Cheese No. 58	Cheese No. 85	Cheese No. 91	Cheese No. 92	Cheese No. 96
	Per cent of Bac- terium lactis acidi	Per cent of Bac- terium lactis acidi	Per cent of Bac- terium lactis acidi	Per cent of Bac- terium lactis acidi	Per cent of Bac- terium lactis acidi	Per cent of Bac- terium lactis acidi	Per cent of Bac- terium lactis acidi
4	90,9	—	—	—	0,10	99,9	—
8	—	—	—	—	9,10	99,0	—
11	90,9	—	—	1,0	—	99,9	—
14	—	90,9	9,1	—	0,01	99,9	0,01
22	50,0	—	—	90,9	9,10	99,9	0,10
30	50,0	1,0	50,0	50,0	—	—	—
37	—	50,0	—	1,0	9,10	90,9	9,10
45	50,0	—	—	90,9	50,00	90,9	0,10
56	—	9,1	50,0	1,0	—	—	—
77	—	99,0	99,0	90,9	50,00	50,0	9,10
86	9,1	—	50,0	1,0	—	9,1	9,10
100	—	90,9	50,0	50,0	50,00	9,1	0,10
113	—	—	—	50,0	50,00	50,0	9,10
124	—	9,1	—	50,0	9,10	9,1	9,10
143	50,0	9,1	9,1	50,0	9,10	50,0	1,00
155	—	—	90,9	99,0	9,10	99,00	1,00
165	—	1,0	—	—	50,00	50,0	50,00
176	50,0	—	99,0	99,0	50,00	1,00	99,00
187	—	50,0	—	50,0	—	—	—
208	—	99,9	99,0	—	99,00	99,0	—

of development of the different groups of lactic bacteria in the cheese and also concerning the ratio existing between them. For this purpose, an area showing well isolated colonies has been circumscribed and every colony within the area has been inoculated into milk. It has been inferred that all tubes of milk that curdled within forty-eight hours at 37° C. contained *Bact. lactis acidii*, while those that curdled between the second and tenth day contained the lactic bacilli. Enough control work was done to show that this method of differentiation was sufficiently accurate for the purpose in hand. The tubes that did not curdle in ten days were examined microscopically to determine the organism present.

A number of cheese have been examined in this way at frequent intervals during the period of ripening. The results are confirmatory of those obtained by the dilution method in milk, although not so striking, since many of the lactic bacilli do not develop on the plate cultures. With this method, unless the lactic bacilli are present in considerable numbers, their presence in cheese is not likely to be detected. They are missed in almost every determination unless they are present at least in a ratio of one to ten of *Bact. lactis acidii*.

From the data presented there would seem to remain no doubt but that the lactic bacilli develop later than the *Bact. lactis acidii* group. They make their appearance in very small numbers as soon as the cheese is made and gradually increase in numbers, usually attaining their maximum during the first month and then slowly decrease in numbers. The number found per gram of the cheese ranges from a few million to 1,000,000,000. Usually they do not attain such great numbers as do the ordinary lactic bacteria. Again their numbers may equal those of *Bact. lactis acidii*, as in cheese 1, Table XI.

Microscopic Examination of Cheese.

It was thought that the gradually changing flora should manifest itself in the appearance of microscopic preparations made from the cheese. At the various periods of sampling, smear preparations have been made from emulsions of the cheese and stained with Gram-Weigerts stain as previously described.

The preparations show in a general way the same change in flora as has already been made evident by the analyses presented. It is not to be expected that the microscopic examination would give results as striking as the cultural, since the latter measures only the living cells, the former all cells that have not lost their staining properties.

Figure 2 has been prepared from camera lucida drawings of typical microscopical fields of several slides made from cheese No. 91. The results of the cultural examination have been presented in Tables XI and XII. It will be noted that rod-shaped organisms do not appear nearly as soon as their presence is shown by the cultural analyses, but that they do at last appear, especially when the cells of the lactic bacteria have greatly decreased in numbers.

Disappearance of Bacterial Cells in Cheese.

The drawings are evidence of the gradual disappearance and disintegration of the bacterial cells in cheese. It is a well-known fact that the enzymes elaborated by bacteria in pure cultures continue to act long after the

death of the cells. It has been shown that the *Bact. lactis acidii* group elaborates enzymes that are able to increase the acidity of milk. As previously indicated, it may be surmised that still other types of enzymes are formed by this group of bacteria. The direct influence of the immense number of acid-forming bacteria, amounting to billions per gram, must be of great importance in cheese ripening; the indirect action through their enzymes may be still greater.

It is certainly true that in normal cheddar cheese the period of development of the ordinary lactic bacteria (the organisms which heretofore have been believed to be the only ones of importance in cheddar cheese, because of their constant presence in great numbers) is followed by the development of another group of organisms, which, while they ferment milk sugar, producing lactic acid, must have some other source of carbon in cheese, on account of the total disappearance of the sugar before their maximum period of development. The influence of the first group has been pointed out early in this paper. The role of the second group cannot at this time be determined; but because of their constant presence in numbers approximating, if not equaling, those of the first group, their influence on the ripening of the cheese cannot be a minor one.

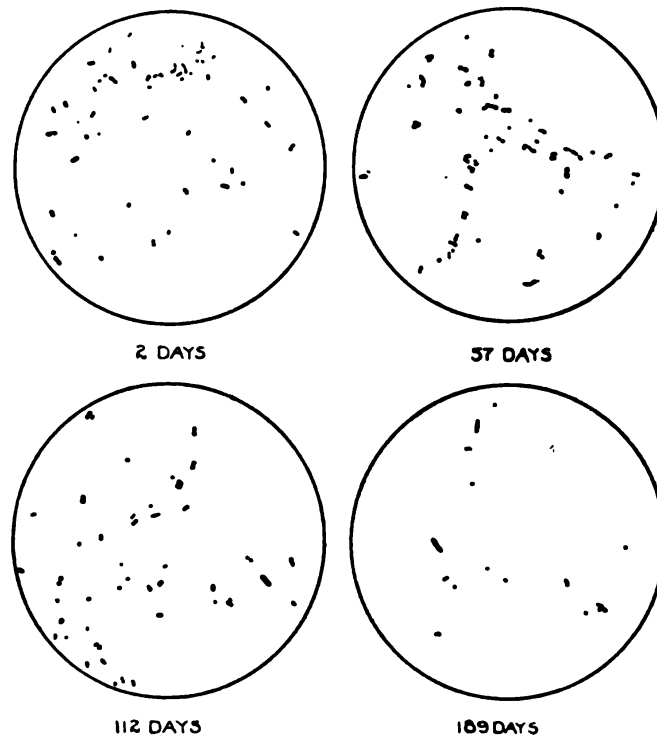


Fig. 2. Types of Bacteria in Cheese No. 91. Camera lucida drawings of typical microscopic fields at different stages in the ripening process of cheese No. 91. At 2 and 57 days the organisms are almost, if not wholly of the *Bact. lactis acidii* group; at 112 days there is a preponderance of *Bact. lactis acidii* and a few lactic bacilli, while at 189 days but few *Bact. lactis acidii* cells remain. The lactic bacilli become more evident.

Detailed Study of Lactic Bacilli.

The work of Freudenberg and numerous later investigators indicates that the lactic bacilli represent a group with certain common characteristics, such as morphology, optimum temperature for growth, and to some extent the compounds produced from the sugar fermented. In all fields of bacteriology it is difficult, at the present time, to draw the boundary lines of any group of bacteria. The placing of the lactic bacilli found in cheese in a single group may be incorrect, but because of the fact that all the cultures studied have certain characteristics in common, it seems best to discuss them as a single group, although more detailed study might

divide them into a number of groups. A comparative study has been made of twenty pure cultures isolated in the course of the work. The main facts of this study are here presented.

The cultures were isolated from cheese with the exception of No. 160, which was obtained from milk. Cultures 58A and 58B represent different colonies from plates made to insure the purity of the cultures to be used in the detailed study. The differences noted in the study of these two cultures originally from the same culture illustrate the differences one may expect to obtain in cultural work.

The action of the different cultures in milk is given in Table XIII, in which they have been arranged according to the degree of acidity produced in milk.

Table XIII.
Action of lactic bacilli in milk.

Cul- ture No.	Per cent of acidity pro- duced in milk		Rotation of the acid	Time of curd- ling, days	Cul- ture No.	Per cent of acidity pro- duced in milk		Rotation of the acid	Time of curd- ling, days
	10 days	45 days				10 days	45 days		
5	0,324	0,91	—	11	116,2	1,20	1,44	inactive	—
152	0,643	1,12	inactive	—	92	1,24	1,40	—	4
52	0,680	1,05	—	9	160	1,37	1,60	dextro	4
165,1	0,690	1,10	—	—	165	1,41	1,57	—	4
163	—	1,26	—	9	113	1,57	1,88	dextro	4
58A	0,890	1,38	inactive laevo	—	71	1,60	1,75	—	4
58B	0,860	1,21	inactive laevo	—	91	1,68	—	—	4
128	0,890	1,20	—	—	85	1,73	1,89	dextro + inactive	4
116	0,810	1,36	inactive	4	116,1	1,75	1,96	—	—
120	1,020	—	inactive	—	96	1,89	2,31	—	3
104	1,170	1,46	dextro + inactive	4					

Acidity Produced.

From the data, it will be noted that both the rate of acid development and hence the time required to curdle milk, as well as the maximum amount of acid produced, varies widely, the acidity varying from 0.91 per cent to 2.31 per cent. The acidity produced by each culture increased after the tenth day. Since the flasks were protected by tinfoil caps, this increase cannot have been due to evaporation.

Out of the several hundred titrations made of milk inoculated with cheese emulsions, but fifteen showed an acidity above 2 per cent. When raw milk is incubated at 37° C. the acidity will often, if not in the majority of cases, exceed 2 per cent and at times may reach 3.5 to 4 per cent. It would thus seem that certain lactic bacilli present in milk do not find favorable conditions for development in cheddar cheese.

Forms of Lactic Acid Produced.

A number of investigators have determined the rotatory power of the lactic acid formed by the lactic bacilli, with varying results. The rotary power of nine of the cultures studied was determined by Dr. J. M. Currie,

with results as given in Table XIII. It will be noted that this type of organism can produce inactive acid or active acid of either modification, or a mixture of the inactive acid with either of the active acids. All of these forms were found in the nine cultures isolated from cheddar cheese with the exception of the pure laevo acid.

Cultural Characteristics.

Of the twenty cultures studied, one failed to grow in any other media than milk, and a feeble growth in glucose bouillon. The other cultures all grew to some extent on lactose agar plates. Some cultures made a quite vigorous growth, others would develop only a few colonies in this medium. The colonies cannot be distinguished from those of *Bact. lactis acidii*. This is probably one reason why previous investigators have failed to find this type of organism in cheddar cheese. A variable growth was obtained upon plates of ordinary gelatin from eight of the cultures. Twelve of the cultures made no growth on gelatin plates.

In most of the more active cultures the reduction of litmus and return of color proceeded in exactly the same manner as in a litmus milk culture of *Bact. lactis acidii*. On the other hand, curdling took place with only a slight or partial reduction of the litmus in some cultures. Slight furrows or tiny holes sometimes appeared in the curd, and gave evidence of a slight gas formation. All of the cultures tested grew in glucose bouillon. Many of the strains made no growth or only a feeble growth in maltose and sucrose bouillon, although all except the culture previously mentioned grew in one or the other or both of these sugars.

The resistance to heat of three-day-old milk cultures was tested by diluting the culture with water and drawing into sterile capillary tubes, which were held for thirty seconds in water at various temperatures. The thermal death point for the different cultures was found to vary between 60° and 70° C.

Morphology.

The bacilli are non-motile and do not bear spores. In a single microscopic field of a slide prepared from a pure culture, the organisms may vary in length from 2.5 microns to 20 or 30 microns or more. Sometimes the filaments are very long. In one of the pure cultures a filament was found 75 microns in length. The filaments are apparently made up of a number of individual cells which, for some reason, do not show the cell divisions, for frequently chains of rods are found instead of filaments. Occasionally in a mixed culture from a cheese inoculation, filaments were found very much curled, or curled at one end, but attempts to isolate a culture which would regularly produce curled filaments always resulted in securing a culture with the usual morphology. No curled filaments were ever observed in pure cultures. The width of the cells in a pure culture seems to be fairly constant; in some cultures the individual cells are all slender, in other cultures they are all comparatively thick. In different cultures the width varies from 0.4 to 1.3 microns. No branching forms have ever been observed.

When stained with methylene blue, the ends of the cells may take the stain much more deeply than the remainder of the cell, or the deeply stained spots may be scattered irregularly in the filament. Occasionally the deeply stained spots appear as tiny nodules on the rod. These characteristic staining

properties are less frequently exhibited when stained by the Gram-Weigert method. In a weakened culture filaments are sometimes found with some of the cells gram positive, some of them gram negative, and other cells taking the stain partially.

Although there is such a wide difference between the cultures in regard to the production of acidity in milk, the other characteristics do not differentiate a culture producing a low acidity from one which produces a high acidity. The morphology, however, seems to bear some relation to the acidity produced, those producing a high acidity being more slender than those producing a low acidity.

The action of the pepsin of the rennet extract activated by the lactic acid results in the formation of peptone from the paracasein. The favorable effect of peptone on the lactic bacilli is shown in the following experiment. Small flasks containing 100 c. c. of sterile plain milk or of the same milk to which different amounts of peptone had been added were inoculated with cultures which produced widely differing degrees of acidity in milk. The results are given in Table XIV.

Table XIV.
Acidity produced by Lactic Bacilli in Milk and Milk containing Peptone.

Per cent of Acidity after 10 days				Per cent of Acidity after 42 days		
Culture	Milk	Milk plus 0.5% peptone	Milk plus 1% peptone	Milk	Milk plus 0.5% peptone	Milk plus 1% peptone
5	0.324	1.19	1.32	0.855	1.35	2.34
92	1.24	1.40	1.58	1.400	1.56	1.77
91	1.68	1.90	2.10	—	2.42	2.29
96	1.58	1.87	1.96	1.930	2.13	2.25

The results show clearly that milk to which peptone has been added is a better medium than plain milk for this group of organisms. This is especially true in the case of culture No. 5, which usually curdled milk in about eleven days, but which curdled the milk to which peptone had been added in two days—more rapidly than the most active cultures curdled plain milk.

Incidentally, this experiment shows that the cessation of growth in milk when a certain percentage of acidity is reached, which is a fairly constant percentage for each particular culture, is not brought about by the antiseptic action of the acid, but by a lack of suitable nitrogenous food.

The action of the enzymes present in the cheese curd brings about an increasing amount of soluble nitrogenous compounds, so that after one month of ripening about 18 per cent of the total nitrogen is in the form of water soluble compounds¹). This action must render the curd a medium favorable to the lactic bacilli, and particularly to those strains similar to culture No. 5, which grow so slowly in milk, or fail to grow at all in milk, as frequently happens.

The dependence of the lactic bacilli upon enzymes from other sources is shown by growing them together with other types of bacteria. Marshall and Farrand²) have shown that when *Bact. lactis acidii* grows

¹) N. Y. Geneva Expt. Stat. Bull. 236. 1903. p. 150.

²) Mich. Expt. Stat. Sp. Bull. 42. 1908.

f the strains

XXI

ur

n

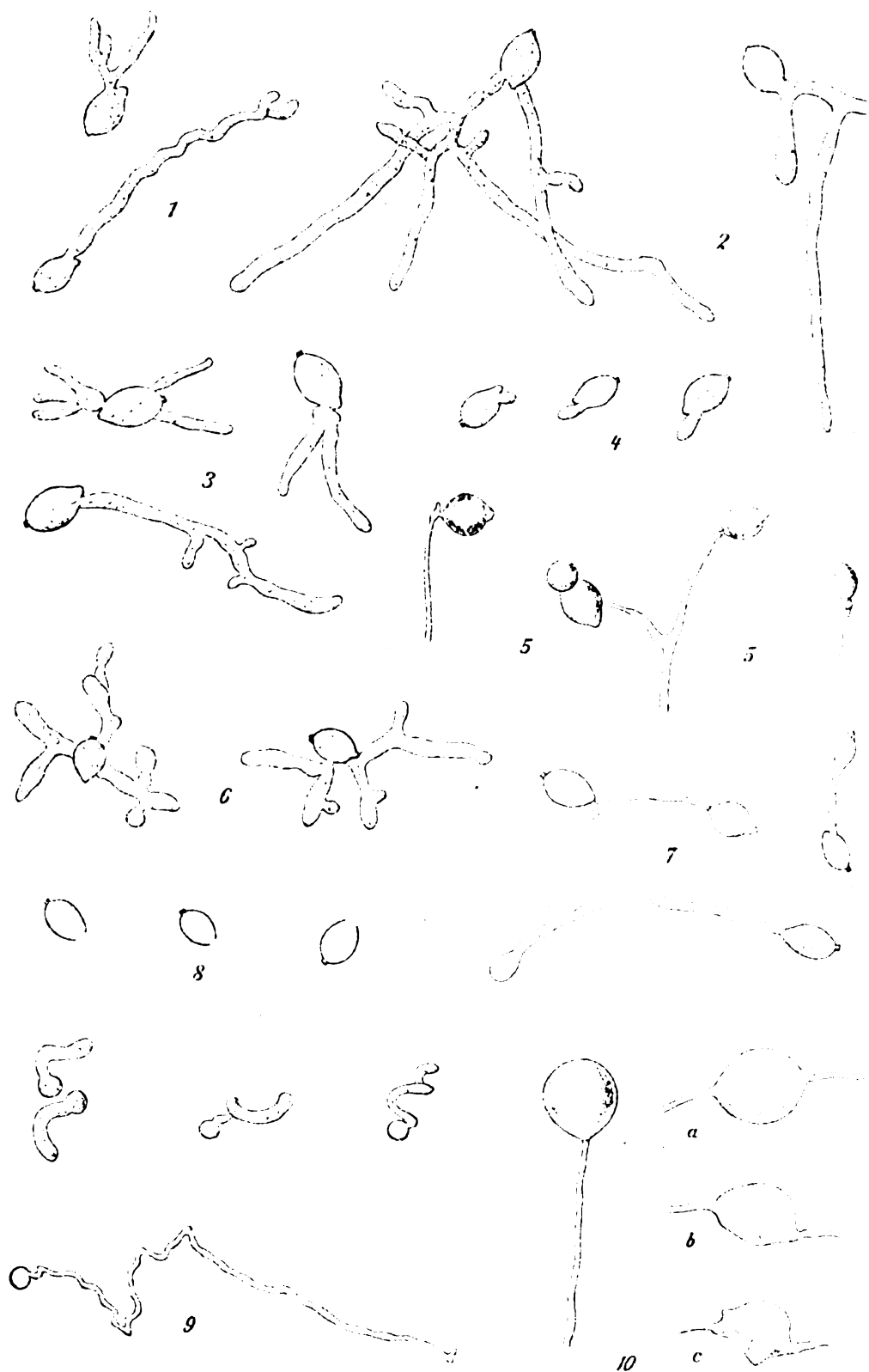
ropiness

g and
arge
and
ous.
ma-
about
day

53°

+

+



Garbowski gez.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

in milk together with certain organisms there is an associative action which accelerates the production of acid and the proliferation of cells. A similar action takes place when the lactic bacilli grow in milk, together with certain other types of organisms.

The stimulating effect upon the lactic bacilli of the associative action of bacteria which produce strong proteolytic enzymes was quite pronounced. When the lactic bacilli were grown together with cultures of certain coccus forms from cheese which have only a slight liquefying action, the stimulating effect was noticeable, though not pronounced.

Solvent Effect of Lactic Bacilli on Milk Proteins.

Freudenreich and other more recent investigators have demonstrated the fact that lactic bacilli exert a digestive action upon casein. The solvent effect of eight of the cultures studied has been determined by the analyses of milk cultures after three months' incubation. The results showed an increase of soluble nitrogen which varied in the different cultures from 12.5 to 62.5 per cent of the soluble nitrogen in the control flask of sterile milk.

Coccus Forms in Cheddar Cheese.

Several investigators have mentioned coccus forms in relation to cheese ripening. Freudenreich and Thöni¹⁾ found regularly a liquefying micrococcus in quite large numbers in fresh Emmental cheese. After experimenting with this organism as a cheese starter they concluded that when present in too great numbers it produced bitterness, but that it disappeared quite rapidly in practical cheese making. Gorini²⁾ isolated a coccus with the property of peptonizing casein in an acid medium from Grana, Emmental, and Edam cheese. He found these forms not only in fresh cheese, but in cheese several months old. In a recent publication Gorini³⁾ states that later investigations have confirmed his opinion that acid-forming peptonizing ferments are important in the ripening of cooked cheese. In this class he includes bacillus forms with those properties and diverse types of cocci. No reference to the finding of coccus forms in considerable numbers has been made in literature on cheddar cheese.

Coccus forms which produce a small amount of acidity were occasionally found to be the predominating type of organism in the cheese studied, as shown by the milk cultures from high dilutions of the cheese. Unfortunately, with the dilution method of analysis this type can be differentiated only when it predominates, for if it occurs in a culture with the other cheese organisms it cannot be distinguished with certainty from the *Bact. lactis acidii* type in a microscopic preparation, and the titration of the milk gives no information, since its production of acidity is less than either the lactic bacilli or *Bact. lactis acidii*. However, this type was found to predominate at some time or other in eleven out of thirteen cheese examined by this method.

The time at which the coccus forms predominated varied from the 14th to the 16th day. This would indicate that they increase early in the ripening period and maintain such numbers for a considerable period. By the use

¹⁾ Rev. Gen. Lait. 2. 1903. p. 241—271.

²⁾ Rev. Gen. Lait. 3. 1904. p. 505.

³⁾ Boll. Uffic. Min. Agr., Indust. e Com. Roma. Anno 9. Serie C. 6. 1910.

of some differentiating medium or by employment of other methods it is hoped that the relative number and importance of coccus forms in normal cheddar cheese can be more definitely determined.

The coccus forms that have been isolated from cheddar cheese vary greatly in cultural characteristics and morphology. A few show a decided liquefying action on gelatin, some none at all. The majority produce a minute depression in the gelatin around the colony, which action is not comparable with that of those organisms usually classed as liquefying bacteria. Many of the cheese cocci, especially the chromogenic forms, produce in milk small crystals, the nature of which has not yet been determined. The various cultures produce acidities in milk varying from 0.0 to 0.8 per cent. The growth upon lactose agar slopes is white in the majority of cases. Chromogenic cocci producing various shades of yellow growth are often found.

Liquefying Organisms.

With the method used in this work liquefying bacilli have never been found in good cheddar cheese. Mention has been made of the liquefying cocci. They cannot be considered of importance in the ripening of cheddar cheese, since they are not consistently present in sufficient numbers to exert any effect.

Sequence in Development of Bacterial Groups in Cheddar Cheese.

In the first part of this article it was stated that the normal ripening of each kind of cheese is to be looked upon as a problem in the ecology of microorganisms, and that the only group of organisms which has been found by previous investigators in every cheddar cheese in great numbers is the *Bact. lactis acidii* group. The work herein reported proves that another group of bacteria, the so-called *B. Bulgaricus* group, develops after the first, and that they reach approximately equal numbers.

Each of these groups of organisms produces certain changes in the cheese mass, consuming the same class of substances and giving out the same by-products in every cheese which ripens normally. The second group takes up the work of decomposition at a certain stage of the ripening, and brings about its own peculiar changes, which possibly prepare the cheese mass for still other types of organisms, and so on to the end of the ripening.

If a certain sequence of groups of microorganisms is essential for the preparation of a certain product from raw material, and if the various members of the sequence find favorable conditions for growth in the raw material, the resulting product will depend on the first member of the normal sequence developing to the necessary degree before the second appears. If the first is overwhelmed by the addition of great numbers of the second, the decomposition changes will not be normal. The presence of great numbers of organisms of the first member of the sequence will not cause a disturbance in the normal decomposition changes. Thus, in the manufacture of cheddar cheese, cultures of *Bact. lactis acidii* are added. The other essential groups of microorganisms are present in the milk in small numbers, but as conditions become favorable they develop in the cheese, and a typical cheddar cheese results.

If heavy inoculations of lactic bacilli are made in milk which contains a small number of *Bact. lactis acidii* the normal ecological balance

will be destroyed, and the result will be an abnormal product. Experiments have been made along this line by the use of milk which has been pasteurized in such a manner that all groups of bacteria have been greatly reduced but not totally destroyed. In its decomposition, such milk is similar to raw milk which contains but few bacteria.

If cheese is prepared from such milk after the addition of a culture of *Bact. lactis acidii*, it may ripen normally. The development of the flavor is usually slower than in a cheese made from raw milk. If to this same milk is added a culture of lactic bacilli instead of *Bact. lactis acidii*, the ripening is not normal. The result is an increased rate of ripening, and the production of an abnormal flavor.

This work also indicates that it is often useless to attempt to establish the role of any organism in cheese ripening by the addition of cultures to the milk to be used, since thereby the natural equilibrium is destroyed and the results obtained indicate that the addition has injured the product, and hence the conclusion is drawn that the organism added is not only not essential, but even harmful, although the organism may be an essential factor in the decomposition changes when developing in its normal sequence.

The constant presence in large numbers is the only certain proof of the importance of an organism or group of organisms in the ripening of any cheese.

Summary.

1. From the same raw materials various kinds of cheese are prepared. These cheese differ especially in flavor. The factors that determine whether a cheese to be prepared from a given quantity of milk, rennet, and salt is to be of one kind or another are to be found in the methods of the cheese maker, who is able to vary in one way or another the composition of the cheese, with the result that conditions are established that favor or retard the growth of the groups of organisms, which must be the determining factors between different kinds of cheese.

2. The only group of bacteria found constantly in great numbers in cheddar cheese by previous investigators is the *Bact. lactis acidii* group. The roles of this group in cheddar cheese are as follows:

- a) They favor the curdling of milk by rennet;
- b) The bacteria of the milk are held mostly in the curd. Through the acid they favor the shrinking of the curd and expulsion of the whey.
- c) The acid so changes the nature of the curd as to cause "matting", or fusion of the pieces of curd;
- d) The acid activates the pepsin of the rennet extract;
- e) The acid prevents the growth of putrefactive bacteria in the cheese.

3. It has been shown that *Bact. lactis acidii* is able to form acid in the absence of the living cell.

4. The development of *Bact. lactis acidii* is followed by the growth of another group of acid-forming bacteria, the *B. Bulgaricus* group. They reach numbers comparable with those of the first group, reaching their maximum numbers usually within the

30*

first month of the ripening. Since they develop after the fermentation of the sugar, they must have some other source of carbon and of energy than milk sugar.

5. It is probable that coccus forms are constantly present in large numbers in cheddar cheese.

Nachdruck verboten.

Über ein aërobes Stickstoff assimilierendes Clostridium.

Siebente Mitteilung über stickstoffbindende Bakterien¹⁾.

[Aus dem physiologischen und dem chemischen Institut der Universität Berlin.]

Von Stephanie Rosenblat-Lichtenstein und Hans Pringsheim. .

Die stickstoffassimilierenden Bakterien werden, nach der bisherigen Auffassung, durch zwei Klassen repräsentiert: die aëroben Azotobacterarten und die anaëroben Clostridium-Arten. In seiner ersten Mitteilung konnte der eine von uns²⁾ zeigen, daß ein dem Winogradsky'schen morphologisch nahe verwandtes Clostridium in der Tiefe eines offenen Kolbens zu gedeihen und Stickstoff zu assimilieren imstande ist. Damit war aber anscheinend noch kein Unterscheidungsmerkmal vom Clostridium Pasteurianum gegeben, denn nach den Untersuchungen von Bredemann³⁾ ist auch diese von Winogradsky im Stickstoffstrom kultivierte Art befähigt, unter mikroaerophilen Bedingungen zu gedeihen. Wir haben diesen Befund mit der Originalkultur, die Herr Bredemann bei Král deponiert hatte, bestätigt. — Eine morphologische Differenz zwischen dem Clostridium Pasteurianum und Americanum schien zuerst in der Sporenkapsel gegeben; doch haben wir uns davon überzeugt, daß auch das Clostridium Americanum, entsprechend den Angaben Bredemanns, eine solche besitzen kann, wenn sie der Spore auch weit seltener anhaftet.

Bei alledem spricht gegen die Berechtigung der Auflösung dieser beiden und der anderen von Bredemann in den Kreis seiner Untersuchung gezogenen Arten noch verschiedenes, wie z. B. das differente Verhalten gegenüber verschiedenen Kohlehydraten. Wir nehmen der Frage gegenüber einen vermittelnden Standpunkt ein, indem wir die stickstoffbindenden Clostridien einem größeren Formenkreise von Bakterien zurechnen, innerhalb dessen eine Differenzierung mit den gewöhnlichen Methoden der Bakteriologie nicht mehr möglich ist. In dieser Auffassung sind wir durch neue experimentelle Untersuchungen bestärkt worden, die uns ein diesem Formenkreis zugehöriges aërobes Clostridium kennen lehrten. Gerade die in bezug auf das Sauerstoffbedürfnis noch bestehende Differenz zwischen den einzelnen Arten, wird von einem völlig objektiven Kritiker⁴⁾ als Einwand gegen ihre Art-einheit hervorgehoben. „Er sagt: das Clostridium Pasteurianum

¹⁾ Sechste Mitt. Über die Assimilation des Luftstickstoffs durch thermophile Bakterien. Dieses Centralblatt. Bd. 31. 1911. p. 23.

²⁾ Dieses Centralblatt. Bd. 16. 1906. p. 795.

³⁾ Dieses Centralblatt. Bd. 23. 1909. p. 385.

⁴⁾ Benecke, W., Bau und Leben der Bakterien. 1912. p. 514.

gilt als anaërob, das *Americanum* nicht.“ Und in der Tat bestehen hier noch ungeklärte Differenzen, denn das *Clostridium Americanum* läßt sich bei völligem Luftabschluß überhaupt nicht zu dauerndem Wachstum bringen. Die neue, von uns aus Erde gezüchtete Art ist in dieser Beziehung noch viel markanter; sie gedeiht nämlich auf der, dem freien Zutritt der Luft ausgesetzten, Agaroberfläche und kann auf ihr mit Leichtigkeit in Reinkultur gezüchtet werden. Die *Bredemannsche* Erklärung, daß im offenen Kolben bei reichlicher Einsaat Bedingungen für die Entwicklung anaërober Arten geschaffen werden können, da die nicht großen Sauerstoffmengen sich auf viele Bakterien verteilen, kann hier nicht mehr herangezogen werden und man wird den Formenkreis der Clostridien recht weit ziehen müssen, wenn man das „*Clostridium aërobicum*“ nicht als neue Art auffassen will. Der Versuch, das *Clostridium Pasteurianum* und *Americanum* in genau der gleichen Weise auf Oberflächenagar zu züchten, ist trotz zahlreicher Versuche fehlgeschlagen; doch wollen wir hier noch kein definitives Unterscheidungsmerkmal annehmen, da ein anderer in der „Umzüchtung“ ja glücklicher sein kann¹⁾. Auch das schwächere Stickstoffbindungsvermögen halten wir bei der großen Variabilität dieses Faktors nicht für ausschlaggebend!

Experimenteller Teil.

A. Isolierung und Kulturversuche.

Erde aus dem Garten des chemischen Instituts wurde, mit Wasser übergossen, mehrere Stunden auf dem siedenden Wasserbade erhitzt; das Filtrat diente hierauf zur Herstellung einer 2 Proz. Glukose enthaltenden *Winogradskyschen* Nährlösung, die 1½ Stunden im Autoklaven bei einem Überdruck von nahezu einer Atmosphäre erhitzt wurde. Drei auf diese Weise hergestellte Nährlösungen kamen wider Erwarten nach viertägigem Stehen bei Zimmertemperatur in starke Gärung, woraufhin der zuerst oberflächliche mikroskopische Befund einer normalen *Clostridium*-Kultur entsprach. Eine Überimpfung in ein bis zur Hälfte mit Wasser gefülltes Kartoffelröhrchen war in 2 Tagen in Gärung, während die Abimpfung in *Winogradskysche* Nährlösung bei 30° nach 5 Tagen zu gären begann. Das Kartoffelröhrchen war der Ausgangsstamm für unsere weitere Untersuchung.

Die mikroskopische Prüfung ergab in den Kartoffelröhrchen neben verschiedenen Stäbchen eine *Clostridium*-ähnliche Bakterienform. Von gut gärenden Kartoffelkulturen wurden verschiedene Proben entnommen und im Wasserbade bei 80° C 15 Minuten lang erhitzt und darauf auf frische Kartoffelröhrchen verimpft. Nachdem in den Röhrchen Gärung eingetreten war, ist auch von diesen die Flüssigkeit abgegossen und bei 80° C während einer halben Stunde im Wasserbade erhitzt worden. Mit diesem Materiale wurden Nähragarplatten (Fleischwasserpepton-Kochsalzagar) angelegt und bei 37° C bebrütet. Auf diese Weise konnten Kolonien derselben *Clostridium*-ähnlichen Formen isoliert werden, welche in der Ausgangskultur aufgefallen waren. Die von den Platten auf Schrägagarröhrchen isolierten Kulturen gaben in den Kartoffelröhrchen zunächst die übliche Gärung. Dieses Verhalten hat sich aber mit der Zeit geändert, so daß jetzt,

¹⁾ Auch *F. Bachmann* (Dieses Centralbl. Bd. 36. 1912. p. 3.) hat von *Bac. amylobacter* Oberflächenkolonien stets nur bei Abwesenheit von Sauerstoff erhalten. (Gelegentlich der Korrektur hinzugefügt.)

nachdem die Kulturen monatelang von Agar auf Agar übertragen worden waren, beim Impfen von Kartoffelröhrchen nur eine Trübung des Wassers, aber keine Gärung mehr einzutreten pflegt.

Gehen wir jetzt zu einer Beschreibung des *Bacillus* über. Im hängenden Tropfen einer 20 Stunden alten bei 37° C gezüchteten Agarkultur sieht man lebhaft bewegliche mittelgroße Stäbchen mit abgerundeten Enden. Sie lassen sich mit den üblichen Farblösungen färben. Die Gramsche Färbung ist schwach positiv. Bei der Färbung mit Jod konnte kein Glykogen nachgewiesen werden. In den nach Peppeler gefärbten Präparaten kann man peritrich angeordnete lange Geißeln wahrnehmen. Schon nach 24 Stunden, manchmal aber erst nach 3—4 Tagen treten die sporenhaltigen Formen auf. Dies hängt ganz davon ab, was für eine Kultur als Ausgangsmaterial benutzt worden ist. Wird eine alte Kultur übergeimpft, so findet man schon am nächsten Tage zahlreiche sporentragende Bazillen, geht man dagegen von einer jungen Kultur aus, so setzt die Sporenbildung viel später und zuerst nur vereinzelt ein. Bevor sich die Stäbchen zur Sporenbildung anschicken, läßt sich bei ihnen eine Formveränderung wahrnehmen, indem sie anschwellen. Die Form, welche sie hierbei annehmen, ähnelt der früher beobachteten *Clostridium* form. Jedoch unterscheidet sie sich von ihr insofern, als die Spore dem einen Pol mehr zugenähert ist, und die hierdurch entstehende Form etwa in der Mitte zwischen einem normalen *Clostridium* und einem *Plectridium* liegt. Die Form entspricht dann der von Bredemann in seiner Arbeit „*Bacillus amylobacter* A. M. et Bredemann usw.“ auf der Tafel I Fig. 47 abgebildeten. Wir haben uns doch entschlossen, in unserem Titel die Bezeichnung *Clostridium* zu wählen, um die Zugehörigkeit unserer Bakterienart zur Klasse des, zuerst als stickstoffbindenden Organismus entdeckten, *Clostridium Pasteurianum* hervorzuheben.

Die Sporen sind rund oder oval. Was die sog. Sporenkapsel anbetrifft, so konnte auch bei unserem *Bacillus* beobachtet werden, daß die Sporen wie von einer starken Protoplasmahülle umgeben zu sein scheinen, indem sie die Sporangienmembranreste mitschleppen, doch ist dies nicht so schön ausgeprägt wie beispielsweise beim *Clostridium Pasteurianum* Winogradsky.

Das Temperaturoptimum für die Züchtung des vorliegenden *Bacillus* liegt bei 37° C. Er wächst auch bei Zimmertemperatur, jedoch nur langsam und spärlich im Vergleich mit den bei 37° C gezüchteten Kulturen. Bei 28° C ist das Wachstum ebenfalls nicht so stark wie bei 37° C.

Die Agarplatte bietet makroskopisch folgendes Bild: runde erhabene, feuchtglänzende Kolonien, im auffallenden Lichte gelblich, im durchfallenden bläulich schimmernd, leicht opaleszierend; mikroskopisch: tiefliegende Kolonien sind gelbbraun, rundlich, vorwiegend aber wetzsteinförmig; bei weiterem Wachstum wie aus mehreren neben- oder übereinander geschichteten oder zusammengehäuften Wetzsteinformen bestehend. Aufliegende Kolonien sind hell, rund, gezackt, nach innen zu gelb bis gelbbraun. In der Mitte meistens die braune ursprüngliche Kolonie. Bei scharfer Einstellung des Mikroskops erscheint die granuliert Oberfläche bei den großen ausgewachsenen Kolonien wie von unregelmäßig von der Mitte nach dem Rande zu verlaufenden verästelten Linien durchschnitten. Wird die Kultur auf Agarplatten mittels Glasspatels aufgetragen, also keine Mischplatten angelegt, so erscheinen die Kolonien hell, nach innen zu gelblich bis gelbbraun ver-

färbt, rundlich, unregelmäßig leicht gezackt, manchmal an der Peripherie wie ausgefasert, granuliert, fast krümelig.

Agarstrich: Feucht glänzender, fast schmieriger gelblicher Belag.

Agarstich: Im Stich unmittelbar unter der Oberfläche schwaches Wachstum. Auf dieser graugelblicher glänzender Belag mit gelappten Rändern.

Zuckeragarstich: Gleiches Wachstum, keine Gasbildung.

Gelatineplatte: Natürliche Größe: anfänglich punktförmige, gelblich verfärbte, glänzende Kolonien. Bei weiterem Wachstum bilden sich große gelappte, bläulich schimmernde Kolonien in der Mitte mit weißgelben Knötchen. Keine Verflüssigung der Gelatine.

Mikroskopisch: Die tiefliegenden Kolonien sind gelbbraun, rund, scharf umgrenzt; bei scharfer Einstellung des Mikroskops kann man noch eine innere scharf konturierte Zone unterscheiden. Bei weiterem Wachstum zeigen die Kolonien unregelmäßig verlaufende, verschlungene, knollige, stellenweise spiralenförmige gewundene Ausläufer.

Aufliegende Kolonien: Rand lappig gezackt, stellenweise leicht gewellt. An der Peripherie hell, nach innen zu gelblich bis gelbbraun. Die Oberfläche von unregelmäßig verlaufenden tiefen Furchen eingeschnitten. In der Mitte die dunkelgefärbte ursprüngliche Kolonie.

Gelatinestich. Stich: Wachstum im oberen Teile bandförmig, weiter unten fadenförmig, weißgelb. Auflage weißgelblich, dick, gelappt, glänzend.

Bouillonkultur: Gleichmäßig stark getrübt. An der Oberfläche bildet sich ein zartes weißes Häutchen, das bald zu Boden sinkt. Bodensatz ziemlich stark, beim Schütteln homogen verteilt.

In der Bouillonkultur ist keine Indolbildung nachzuweisen.

Zuckerbouillon: Trübung etwas stärker. Häutchen mehr ausgebildet.

Milch: Nach ungefähr 14 Tagen wird das Kasein ausgefällt und allmählich aufgelöst.

Kartoffelkultur: Auf der Oberfläche des Kartoffelkeils ist so gut wie nichts vom Wachstum zu sehen. Das Wasser trübt sich.

B. Prüfung des Stickstoffbindungs-Vermögens.

Die Versuche über das Stickstoffbindungsvermögen des aeroben Clostridiums wurden in derselben Weise, wie das in den früheren Mitteilungen beschrieben ist, ausgeführt. Zur Verwendung kamen je ein Liter der Winogradskyschen Nährlösung, die zur Vergärung im Brutraum bei 37° aufgestellt wurden. Die folgende Tabelle enthält die Resultate der Assimilationsversuche, die zuerst mit der ursprünglichen Rohkultur und später mit der auf Platten isolierten Reinkultur beimpft wurden:

Mit Rohkultur beimpft.

g Glukose pro L.	beimpft	analysiert	g N assimiliert	mg N pro 1 g Zucker
5 g	28. Juni 11	27. Okt. 11	0,0074	1,76
10 g	19. Juli 11	„	0,0102	
			0,0167	1,67
Mit Reinkultur beimpft				
5 g	7. Juni 12	23. Okt. 12	0,0090	1,73
	„	„	0,0083	

Vergleicht man diese Resultate mit den früher beim *Clostridium Americanum* in denselben Konzentrationen erhaltenen Werten: 3,2 mg in 0,5-proz. und 2,85 mg in 1-proz. Lösung pro 1 g vergorenen Zucker, so sieht man, daß das aërobe *Clostridium* in seinem bisher beobachteten Stickstoffbindungsvermögen hinter dem früher entdeckten um fast die Hälfte zurückbleibt.

Berlin, am 24. Oktober 1912.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der Zellulosegärung.

Von W. Omeliansky, St. Petersburg.

In der II. Abteilung des Centralblattes für Bakteriologie Bd. 34. No. 18/22. p. 485 ist ein Aufsatz von K. F. Kellerman und J. G. McBeth „The fermentation of Cellulose“ erschienen, in welchem die Verfasser bestrebt sind, den unter Bildung gasförmiger Produkte — CO_2 , H_2 und CH_4 — verlaufenden Prozeß der anaëroben Zellulosezersetzung von einem neuen Gesichtspunkte aus zu beleuchten. Diese Zersetzung wurde bekanntlich bisher als ein selbständiger Gärungsvorgang angesehen, welcher durch die Wirksamkeit der anaëroben Mikroben der Methan- und Wasserstoffgärung der Zellulose hervorgerufen wird. Im Gegensatz zu dieser Ansicht nehmen die Verfasser an, daß der Prozeß ein zusammengesetzter ist und als das Resultat der aufeinanderfolgenden Wirkung zweier Gruppen von Mikroorganismen erscheint, von denen die eine unter aëroben Bedingungen und ohne Gasentwicklung Zellulose spaltet, während die andere die hierbei entstandenen Produkte unter Bildung von Gasen vergärt. Als zur ersten Gruppe gehörig beschreiben die Verfasser drei neue Arten: *Bac. flavigena*, *Bac. amylolyticus* und *Bac. rossica*, von denen nur die zweite sporuliert (zentrale, längliche Sporen), die beiden anderen aber keine Sporen bilden. Keine der genannten Arten stimmt mit den früher beschriebenen¹⁾, von mir isolierten Erregern der anaëroben Zellulosezersetzung überein, und zwar weder in ihrer äußeren Erscheinung, noch auch in ihren Eigenschaften. Es erweist sich, daß diese Arten zu denjenigen gehören, welche auf den gewöhnlichen Fleisch-Pepton-Medien unter aëroben Bedingungen ausgezeichnet wachsen und Gelatine verflüssigen. In Pepton-Wasser mit Zusatz verschiedener Kohlehydrate (Dextrose, Saccharose, Laktose, Maltose, Stärke) und mehratomiger Alkohole (Glyzerin, Mannit) bilden sie Säuren, ohne Gase zu entwickeln. Ihres Verhaltens zur Zellulose unter solchen Bedingungen erwähnen die Verfasser auffallenderweise überhaupt nicht. Auf Agarnährböden mit Zusatz von 1 Proz. Stärke und 0,1 Proz. Kreide entstehen um die sich entwickelnden Kolonien des *Bac. amylolyticus* ausgedehnte Lösungszonen infolge von Spaltung der Stärke und Bildung von Säuren. Eben solche, jedoch bedeutend schwächere Lösungszonen („enzymic zones“, wie sie die Verfasser nennen) erhält man auch auf Platten, in denen die Stärke durch aus ammoniakalischer Kupferoxydlösung gefällte Zellulose ersetzt ist.

¹⁾ Vgl. meine Aufsätze in diesem Centralbl. Abt. II. Bd. 8. p. 193, 225, 257, 289, 321, 355, 385; Bd. 11. p. 369; Bd. 12. p. 33, sowie das Kapitel „Die Zellulosegärung“ im „Handb. der techn. Mykol.“ Bd. 3. p. 245.

Das Auftreten dieser „enzymic zone“ um die Kolonien auf den Zelluloseplatten ist das einzige im Aufsatz erwähnte und offenbar nach der Meinung der Verfasser ausreichende Argument, um die obengenannten Arten zu den Zellulosefermenten zu zählen. Uns persönlich erscheint ein derartiges Argument höchst zweifelhaft. Die Zonen um die Kolonien können sich gebildet haben infolge von Auflösung der Kreide durch Säuren, welche ihrerseits entstanden sein können bei der Zersetzung von organischen Substanzen des Leitungswassers, von Extraktivstoffen des Agars, von Produkten partieller Hydrolyse des Agars in Gegenwart von Mineralsalzen und dergl. mehr. Entsprechend den geringen Mengen zersetzter organischer Substanzen kamen naturgemäß auch nur verhältnismäßig unbedeutende Lösungszonen der Kreide um die Kolonien zustande. Wir sind freilich nicht in der Lage, auf einer solchen Auslegung zu bestehen, da wir die Einzelheiten der Versuche nicht kennen und über keine anderen Daten verfügen, als diejenigen, welche in dem Aufsätze mitgeteilt sind; jedenfalls aber haben wir auf das vorliegende Material hin allen Grund, eine derartige Vermutung auszusprechen. Auffällig ist überhaupt in dem Aufsätze, neben großer Ausführlichkeit in der Beschreibung untergeordneter Details, der Mangel irgendwelcher Angaben (außer der zweifelhaften „enzymic zone“) bezüglich der Hauptfrage der Untersuchung — der Zellulosegärung. Daher erachten wir, solange keine neuen, überzeugenderen Tatsachen erbracht werden, die Frage von der Zugehörigkeit der beschriebenen Arten zu den Zellulosefermenten als offenstehend.

Unbedingt irrtümlich aber in der Auffassung von Kellerman und McBeth ist ihre Erklärung des Mechanismus der von mir studierten anaeroben Zellulosegärung. Die Beteiligung sporenfreier Bakterien an diesem Prozesse muß schon allein darauf hin ausgeschlossen werden, daß es gelingt, die anaerobe Zellulosegärung durch eine lange Reihe von Generationen hindurch zu unterhalten, wobei zur Aussaat jedesmal pasteurisiertes Impfmateriale verwendet wird. Ebenso unverständlich bleibt es, welche Rolle aerobe Zellulosezerstörer bei streng anaeroben Bedingungen spielen sollten. Meine Versuche sind ja nicht nur in langhalsigen Gärkolben ausgeführt worden, wo die Bedingungen der Anaerobiose besonders im Anfange eventuell nicht absolut strenge sein können, sondern auch bei völligem Ausschluß freien Sauerstoffs (frisch ausgekochte Medien, Vakuum, alkalische Pyrogallollösung usw.). Hierbei sammelten sich in den Kulturen jedesmal die charakteristischen Erreger der anaeroben Zellulosezersetzung an, welche auch von den anderen Forschern bei Wiederholung meiner Versuche beobachtet worden sind. Es sei noch bemerkt, daß die Verfasser nichts darüber angeben, was ihnen die mikroskopische Untersuchung der 6. Generation der unter den von mir angewandten Bedingungen gezüchteten Kulturen ergeben hat. In dieser Beziehung lassen uns die Verfasser ebenso völlig im dunkeln, wie überhaupt in allem, worin ihre Arbeit den Kernpunkt der Frage — die Vergärung der Zellulose — berührt.

The Protein and Phosphorus Content of *Azotobacter* Cells¹⁾.

By Conrad Hoffmann,

Agricultural Bacteriological Laboratories. Agricultural Experiment Station,
Madison, Wis.

Results secured by Stoklasa²⁾ upon analysis of *Azotobacter* cells grown in liquid media reveal a nitrogen content, which when expressed on the protein basis, is equivalent to 61.25 to 71.875 per cent of protein. The phosphorus content of such cells, according to Stoklasa³⁾, amounted to 4.93 per cent when expressed as P_2O_5 . At this Station⁴⁾ results have been secured which are considerably lower than the above. Thus, by modifying the media upon which the *Azotobacter* was grown it was possible to secure cells showing a range of from 8.3 to 12.00 per cent of protein, the maximum protein content found in any case being the latter figure. These results were obtained upon material prepared by the agar plate method described in reference No. 3. The maximum P_2O_5 content found on such material was 2.97 per cent which was in a culture thirty days old. Unfortunately, no specific data are given by Stoklasa as to the exact age of his cultures. Only in one instance is mention made of the age of a culture upon which analysis was made, that being an eight-day-old culture. It is reasonable to suppose, however, that most of the cultures were approximately of the same age in both instances, and upon this supposition subsequent deductions are made.

It is apparent from the data above referred to that a seemingly wide discrepancy exists between the results of Stoklasa and those of the author. It seems therefore advisable to attempt an explanation of these differences, for repetition of the analyses have substantiated the original results in both instances.

Naturally, the method of securing the material for analysis exerts considerable influence upon the composition of the same. Stoklasa in securing his material for analysis employed large Erlenmeyer flasks to which 200 or 250 ccm. of a culture medium containing 20 grams of mannite and 0.5 grams of K_2HPO_4 per liter were added. In these, after sterilization, growth of *Azotobacter* was allowed to take place. After varying periods of incubation, the contents of the flasks were emptied into tall glass cylinders, the growth allowed to settle, and the supernatant liquid siphoned off. The sediment was then filtered, washed in distilled water, and dried at 50 or 60° C. Analysis of this dry *Azotobacter* material gave results as already mentioned, which were further substantiated by a subsequent repetition of the analyses.

In contrast to the above method of Stoklasa for securing a sufficient mass of *Azotobacter* cells for chemical analysis, the method employed at this Station made use of an agar medium containing 15 to 20 grams of mannite and 0.2 grams of K_2HPO_4 per liter. This medium was added in 50 or 100 c. c. portions to large 11-inch Petri dishes. These

¹⁾ Published by the permission of the Director of the Wisconsin Agricultural Experiment Station.

²⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 29. 1911. p. 457.

³⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. 1908. p. 631.

⁴⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. 1910. p. 127.

were then sterilized and subsequently allowed to solidify. Inoculation was made by adding 5 ccm. of a suspension of an *Azotobacter* culture in distilled water, and distributing the same uniformly over the entire surface of the agar in the plate in the form of a thin water film. The growth, which was very luxuriant, was removed by means of a smooth-edged glass slide and dried at 100° C. without further treatment. It was then pulverized and used for analysis. We have thus not only a difference in the two methods of preparation but also a difference in the amounts of K_2HPO_4 present, factors both of which no doubt influence the chemical composition of the cells secured by the respective methods.

The difference in the amounts of growth secured by the two methods is most marked and worthy of mention. From ten flasks, each containing 250 ccm. of culture medium, Stoklasa was able to secure 2.0075 grams of total dry growth or bacterial cells. This is a trifle less than one gram of growth from one liter of medium which contained 20 grams of mannite and 0.5 grams K_2HPO_4 . The plate culture method on the other hand yielded an average of a little more than 0.5 grams of dry cells per plate, equivalent to five grams of growth per liter of agar containing 20 grams of mannite and but 0.2 grams of K_2HPO_4 . It is obvious then that differences in the composition of the cells secured by these two methods should exist.

The results on the protein content of *Azotobacter* when grown on the agar above mentioned are remarkably low and at first thought appear incorrect. Such organisms as *Sarcina lutea* and *Bacillus subtilis* revealed a protein content of about 60 per cent, whereas *Azotobacter* showed a maximum of 12.00 per cent of protein. This is indeed strange, in view of the fact that the first two organisms mentioned do not fix nitrogen. On the other hand, Stoklasa's results on *Azotobacter* grown by the liquid medium method correspond more closely with those obtained at this Station on *Sarcina lutea* and *Bacillus subtilis*. The question therefore naturally arises as to the cause of the low protein content of the *Azotobacter* cells grown on the agar medium. The far greater quantity of cell material secured on this solid medium in contrast to that secured by Stoklasa with his method upon a medium very similar in composition, but liquid, possibly suggests that in Stoklasa's method certain soluble materials are washed out which are retained by the plate method and which account for the greater bulk of growth.

One of the characteristics of *Azotobacter* is the production of a mucilaginous zoogloal mass, particularly when grown on solid medium, this being far less pronounced in liquid media. This zoogloal mass is undoubtedly of a non-nitrogenous and possibly non-phosphorous nature. It is made up largely of carbohydrates, presumably pentosans and other compounds of a similar nature. Their less abundant formation and possible removal by washing, as practiced in Stoklasa's method, would tend to reduce the total dry weight and concentrate the nitrogen, increasing its relative percentage; whereas their retention, as in the plate method, would increase the dry weight and dilute, so to speak, the nitrogen, decreasing its relative percentage.

If this supposition is correct, it should apply equally well to the P_2O_5 content of the bacterial masses secured by the two methods. Then the ratio between the protein content of *Azotobacter* secured by the two me-

thods should correspond closely to the ratio existing between the P_2O_5 content of the cells by both methods.

Table I.
Protein and P_2O_5 Content of Azotobacter Cells.

Protein			P_2O_5		
Stoklasa		Author	Stoklasa	Author	
20 % mannite	1,5 % mannite	2,0 % mannite	20 % mannite	1,5 % mannite	2,0 % mannite
61.25 to 71.875	12.00 9.62	11.62 9.68 10.50 8.31 16.37 15.62 17.75	4.93	1.08 2.06 2.86 3.04	0.895 2.51 2.58 2.97
66.56 6.15 5.19	10.81 1	12.83 1	4.93 2.18 2.20	2.26 1	2.238 1

Consultation of the data in Table I, however, fails to reveal such a relationship. There is a much greater difference in the protein contents secured by the respective methods than in the P_2O_5 determinations. Thus, the protein ratio between Stoklasa's results and those of the author equals 6.15/1 and 5.19/1 in contrast to the P_2O_5 ratio of 2.18/1 and 2.20/1 respectively.

The question immediately presents itself as to the composition of the diluting zoogloal mass. If it is non-nitrogenous and non-phosphatic then the ratios above mentioned should approximate equality. In case the zoogloal mass contains P_2O_5 , then the results are explainable, assuming, of course, the accuracy of the determinations in both cases.

One must at all events concede a greater nitrogen-fixing efficiency in liquid culture media than upon a solid substratum. Furthermore, the zoogloal mass undoubtedly serves to dilute by weight as it were the nitrogen and phosphorus content of the *Azotobacter* cells proper.

The above is given merely as an endeavor to present certain facts to explain the apparent discrepancies between the results of Stoklasa and those of the author on the protein and P_2O_5 contents of *Azotobacter* cells. It would seem that they are not due to analytical errors on the part of the author, as inferred by Stoklasa, but rather to the different methods of cultivation employed in securing the cells for analysis.

Nachdruck verboten.

The Intensity of Nitrification in Arid Soils.

[Contribution from the Chemical Laboratory Utah Experiment. Logan, Utah, U. S. A.]

By Robert Stewart.

Historical.

It is a very common conception that nitrification takes place with great intensity in arid soils. Thus Hilgard¹⁾, in discussing the intensity of nitrification in arid climates, says: "Of the efficacy of nitrification under arid conditions abundant evidence may be found in the State of California. In the alkali lands of southern California, the nitrates of soda, lime and magnesia are almost universally present; they form at times as much as one-fifth and even more of the entire mass of alkali salts, and in one case the total amount in the soil has been found to reach two tons per acre with an average of twelve hundred pounds over ten acres." It should be carefully noted that these accumulations of nitrates occurred in alkali soils, together with the other more common alkali salts. But Hilgard evidently assumed that their formation was taking place with great rapidity at the present time.

Colmore²⁾, working under Hilgard's direction in 1892, made a study of the distribution of the alkali salts from the centre of an alkali spot to the outer edge. Some of the results he obtained are recorded below:

Table I.
Distribution of Salts in an Alkali Spot.
Results reported as pounds per acre foot of soil.

Location	Centre	Eight foot from centre	Outer margin
Total salts	1368	1942	827.9
Nitric nitrogen67	2.77	.17

It may be noted that the greatest quantity of nitric nitrogen occurs in the eighth foot from the centre, together with the greatest quantity of total alkali salts. The nitrates are thus seen to be closely associated with the other alkali salts. The nitrates must either have been brought up from lower depths or else the alkali salts must exert a very marked influence in increasing the rate of nitrification. Hilgard evidently assumes the latter conception to be true.

Recently Headden³⁾ has found abundant accumulation of nitrates retained in alkali soils of Colorado which he attributes to the fixation of atmospheric nitrogen by bacterial action at the present time. While it is probable that the nitrogen fixed by the micro-organisms of the soil is in the form of protein nitrogen, Headden believes that nitrification takes place at the same time, thus also assuming that nitrification takes place rapidly in arid soils, since the amount of nitrates present in the Colorado soils reaches enormous quantities per acre.

¹⁾ Hilgard, Soils. p. 68.

²⁾ Colmore, Rep. California Exp. Sta. 1892—94.

³⁾ Headden, Bull. Colorado Exp. Sta. Nos. 155 and 178.

There are a number of other examples of nitrate accumulations occurring in arid soils, such as those of Turkestan¹⁾, India²⁾, and China³⁾, while deposits of nitrates in arid climates have been discussed by Clark⁴⁾. But invariably the nitrates are accompanied by the chlorides or sulphates of calcium, sodium or magnesium, and these accumulations occur in arid climates where the limited amount of rainfall would prevent rapid bacterial action at the present time, owing to the limiting moisture factor. Thus Lubvain, in discussing the accumulation in Turkestan, says: "The earth, which is of a pale cinnamon color, is dry and can be readily pulverized between the fingers." The 10.61 per cent of nitrates of sodium, potassium and magnesium is accompanied by 12.90 per cent sodium chloride, 3.25 gypsum, and 0.66 of magnesium sulphate.

In our extensive investigations⁵⁾ at the Utah Station regarding the production of nitrates in arid soils, we failed to find any evidence confirming the conception that nitrification takes place with great intensity in arid soils. Notwithstanding the common conception we found⁶⁾ that: "The average measurable amount of nitric nitrogen formed during a year, which can be clearly attributed to formalin under the influence of irrigation water, is only 28 pounds under the most favorable treatment with water", while Warrington estimates that in 1880—81 89.5 pounds of nitric nitrogen and in 1881—82 86.5 pounds of nitric nitrogen was formed in the Rothamsted soils under humid conditions. Since our results were so diametrically opposed to the common conception, we were led to make a critical analysis of the situation to locate if possible the discrepancy. It appeared to us that there was either⁷⁾ some essential fault in our work, since the soil upon which we were working was ideally adapted to bacterial activity and the limiting moisture factor had been removed by irrigation; or¹⁾, the common assumption that nitrification takes place rapidly in arid soils was wrong. An examination of our own work failed to locate an essential error in method, and the large number of determinations precludes the possibility of error of analysis, therefore the analysis of the situation led to the critical examination of Hadden's results as previously reported⁸⁾, and finally to the conclusions embodied in this paper.

It is thus seen that the conception that nitrification takes place with great intensity in arid climates rests upon the observation that in certain arid soils there occur accumulations of nitrates in the surface soils. It must be noted, however, that these accumulations of nitrates always occur with accumulations of other water soluble salts. There are no reported results showing accumulations of nitrates without the presence of these alkali salts. The nitrates and the alkali salts must be associated in some way. The alkali salts must exert a very markedly favorable influence on the process of nitrification or else the nitrates must be derived from the subsoil in the same way as are the al-

¹⁾ Journ. Chem. Soc. Vol. 48. 1885. p. 128.

²⁾ Leather, Bull. No. 24. Agricultural Research Institute. Pusa 1912.

³⁾ King, Farmers of Forty Centuries.

⁴⁾ Clark, Data of Geo. Chemistry Bull. 491; U. S. Geol. Survey. p. 241—246.

⁵⁾ Stewart and Greaves, Bul. 106. Utah Exp. Sta. 1908. Centralbl. f. Bact., Abt. II, Bd. 34. p. 115.

⁶⁾ Stewart and Greaves, Centralbl. f. Bact. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 128.

⁷⁾ Warrington, Office of Exp. Sta. U.S.D.A. Bul. 8. 1892. p. 72.

⁸⁾ Stewart and Greaves. Bul. 114. Utah Exp. Sta. 1911.

kali salts. Stewart and Greaves¹⁾ have already presented some very good evidence that this latter conception is correct. A critical examination of the results reported by Dr. Headden of the nitrate accumulations in some Colorado surface soils indicates a close relationship between the accumulation of nitric nitrogen and chlorine, thus indicating a common origin.

The Accumulation of Nitrates in Arid Soils.

These accumulations of nitrates in alkali soils is attributed by Hilgard to the rapidity of nitrification of the organic matter of the soil at the present time and by Headden to fixation of the free nitrogen of the atmosphere.

In the above discussion, it has been clearly pointed out that the accumulation of nitrates is closely associated with the accumulation of alkali. How, then, does alkali accumulate? According to Hilgard, the slow weathering of the rock particles of the soil gives rise to the formation of water soluble salts, which in a humid climate, are washed out through the drainage to the rivers and thus carried to the sea, while in arid climates the rainfall is only sufficient to carry the salts to lower depths where they accumulate. With the application of irrigation water, these salts rise to the surface and on the evaporation of the water the salts remain behind as a white or black incrustation. Why may not the nitrates accumulate in arid soils in exactly a similar way? In some favored sections in the arid west the soil is markedly free from alkali accumulations owing to the well drained character of the land, the water soluble salts being washed out and carried to the lower lying land where they accumulate. Surely the forces which cause a concentration of the sodium chloride, sodium sulphate or sodium carbonate would also operate with the equally soluble sodium nitrate.

In Utah and some portions of Colorado, much of the alkali is of marine origin. In early geological times much of the section consisted of inland seas, which received the deposits of silt and sand from the higher land. The waters receiving these deposits were shut off from the ocean and as the water evaporated the salts were deposited. The deposits of rock material became impregnated with layers or deposits of water soluble salts. The soil formed from such material must be susceptible to alkali accumulations. Thus the famous Book Cliff in eastern Utah, and western Colorado, running almost parallel to the R. G. W. Rail Road, consist of shale impregnated with layers of water soluble salts, made up of gypsum, sodium nitrate, sodium chloride, sodium sulphate and the chloride and sulphate of magnesium. The erosion and recession of these cliffs have given rise to a section of agricultural soils at the base of the cliffs extending from Helper, Utah, to Palisades, Colorado, a distance of 190 miles long, and having an average width of twelve miles. It is in these lowlands that the soil of the Grand Junction section of Colorado and the Green River section in Utah, is located. The soils of the Grand Junction section contain accumulations of nitric nitrogen and water soluble salts as already reported by Headden.

The soils at Green River, Utah, are identical with those reported by Headden, being formed out of the same material in the same way²⁾.

¹⁾ Stewart and Greaves, Utah Exper. Stat. Bull. No. 114.

²⁾ U. S. Geolog. Surv. Bull. 371. p. 9.

A recent examination of these soils gave some very interesting results. The soils examined at Green River, Utah had been cultivated only three years, prior to which they had been in the virgin condition and had supported only a meagre growth of desert vegetation, such as stunted grease wood and shad scale, the amount of rainfall (7.5 inches) not being sufficient for the vigorous growth of vegetation.

In Table 2 are recorded the results obtained from an examination of the water soluble salts.

These results show that these typical soils contain a high percentage of water soluble salts which consists largely of gypsum, or calcium sulphate. The amount of soluble carbonate is very small and, while it has been here reported as sodium carbonate, it very probably consists of calcium carbonate. The amounts of sodium chloride and sodium sulphate in the surface feet are very low but increase markedly with depth. The amount of nitric nitrogen in the soil is slightly higher than normal for arid soil and has a tendency to accumulate in the first and sixth feet.

Table 2.
Green River Soils. Emery County, Utah.
Typical bench land soil north of Green River, Utah.
Peach orchard. Results reported as per cent of dry soil¹).

Depth of sample	Description of soil	Total organic nitrogen	Total water soluble salts	Calcium sulphate	Sodium carbonate	Sodium chloride	Sodium sulphate	Magnesium sulphate	Nitric nitrogen P. P.M
1	Formed	0.04	1.83	1.53	0.02	0.02	0.17	0.07	10
2	from shale	0.04	2.38	1.96	0.02	0.02	0.11	0.10	3.0
3	in place	0.04	2.22	1.63	0.02	0.02	0.16	0.12	3.0
4	Plowed first	0.04	2.07	1.52	0.02	0.03	0.23	0.11	3.0
5	in 1907	0.03	2.86	1.78	0.02	0.04	0.80	0.13	3.0
6	Shad scale	0.04	3.77	1.75	0.02	0.20	1.34	0.07	13.0
Aver	growth	0.038	2.52	1.69	0.02	0.06	0.45	0.10	6.0

An examination of the alkali accumulation on the surface of this soil presents some instructive results, as may be seen by an examination of Table 3:

Table 3.
Composition of "alkali" from above soils.
Results reported as per cent of dry soil.

Depth of sample	Description of sample	Total organic nitrogen	Total water soluble salts	Calcium sulphate	Sodium carbonate	Sodium chloride	Sodium sulphate	Magnesium sulphate	Sodium nitrate	Nitric nitrogen P. P.M
¹ / ₈ in	Hard crust	0.068	1.23	0.93	0.04	0.04	—	0.09	—	12.0
Sur-	Loose salts	—	12.23	1.82	0.05	2.03	5.99	0.56	1.21	2000
face	Loose salts	0.030	43.23	1.66	0.06	1.51	39.16	0.50	0.12	200
"	Loose salts	0.129	7.50	1.31	0.05	3.04	0.53	1.53	0.60	1000
Aver			16.05	1.43	0.05	1.65	11.42	0.67	0.49	803

¹) All results in the following tables, unless otherwise noted, reported as per cent of dry soil.

These accumulations were of two kinds, one in which a hard crust was formed, the other where the material was loose. The hard crust was found to consist largely of gypsum, containing a small amount of other soluble salts, including some nitric nitrogen. The loose material contained much less gypsum but greater amounts of the sulphate and chloride of sodium and was exceptionally rich in nitric nitrogen, two of the samples containing 2,000 and 1,000 parts per million, respectively, of nitric nitrogen, which is equivalent to 1.20 and 0.6 per cent of sodium nitrate on the basis of the dry soil. It should, of course, be kept clearly in mind that these accumulations occur only in very small patches. The composition of the water soluble salts of several other soils representative of the section are reported in Table 4.

Table 4.
Shale soils. Characteristic of section.

Depth of sample	Description of soil	Total water soluble salts	Calcium sulphate	Sodium carbonate	Sodium chloride	Sodium sulphate	Magnesium sulphate	Sodium nitrate	Nitric nitrogen P.P.M.
1	North of Green River, typical soil	1.91	1.33	0.02	0.05	0.23		0.03	42.
2	" "	2.84	1.78	0.01	0.12	0.59		0.03	44.
1	Uniform desert soil west of Green River	2.24	1.82	0.04	0.01		0.18		3.
2	" "	2.38	1.91	0.04	0.01		0.19		2.
1	"Dead soil" . . .	3.17	1.69	0.03	0.10	1.12	0.08		18.
2	" " . . .	3.14	1.42	0.02	0.14	1.14	0.17		16.
3	" " . . .	3.68	1.59	0.02	0.25	1.43	0.16		22.

It is thus readily seen that the soils of this section are much richer in nitric nitrogen than are the normal soils of the arid region, and that with the accumulation of the alkali salts at the surface, the nitric nitrogen also increases to a remarkable extent. What is the source of the nitrogen? An examination of the rock material out of which these soils are formed will throw some light on the question. Four samples of material contributing to the formation of the soil in this section were secured and submitted to analysis. The results are recorded in Table 5.

Table 5.
Soil forming material. Green River, Utah.

Depth of sample	Description of soil	Total organic nitrogen	Total water soluble salts	Calcium sulphate	Sodium carbonate	Sodium chloride	Sodium sulphate	Magnesium sulphate	Nitric nitrogen P.P.M.
1	Salts in gulch in Book Cliffs. . .	22.21	1.54	0.02	3.74	15.30	1.54	0.04	66.0
2	Shale Book Cliffs .	2.5	0.68	0.03	0.49	1.42	.11	0.02	32.0
3	Shale NW of town	1.05	0.12	0.12	0.04	0.56		0.21	354.0
4	Striation of salts in shale	5.19	3.57	0.04	0.06	1.55		0.08	140.0

Zweite Abt. Bd. 36.

31

Sample No. 1 consisted of salts deposited in a gulch at the base of the Book Cliffs. The salts were incrustated on a few inches of soil which had apparently never supported a growth of vegetation of any character. They had apparently been washed from the adjacent cliffs by a recent shower and, on evaporation of the water, deposited on the soil. This material consists largely of sodium sulphate and is rich in nitric nitrogen. No. 2 and No. 3, samples of shale, are exceptionally rich in nitric nitrogen. Sample No. 3 contains 0.035 per cent of nitric nitrogen, or 0.212 per cent of sodium nitrate, expressed on the basis of the soil itself. The richness of this soil forming material in nitric nitrogen and its vast extent, extending as it does 190 miles east and west and at least twelve miles north and south, readily accounts for the accumulation of nitric nitrogen in the soil at those points where the exposed shale causes a concentration of the salts by the movement of the soil moisture.

The question, no doubt, will arise, why should these accumulations occur only in patches and not be more uniformly distributed throughout the soil? To appreciate this condition, the material out of which the soil is formed should be kept in mind. The term "Book Cliffs" was applied to these cliffs because they appeared like a huge book lying horizontally, the strata looking like the leaves of a closed book. Now, when these cliffs receded by erosion, the soil formed was of varying degrees of thickness. At places the undecomposed shale was almost exposed, while at other places it was buried underneath several feet of soil. On the application of irrigation water to the soil, the water would penetrate to the shale and then follow the horizontal strata, carrying in solution the dissolved salts. At the places where the strata were near the surface, the moisture would rise, carrying the salts in solution and on the evaporation of the water the salts would remain behind. In some cases a bog¹) would result at these places and finally an alkali spring.

The shale composing the Book Cliffs is capped by sandstone. East of Green River this sandstone has contributed largely to the soil formation. The results obtained from the analysis of the water soluble material in this soil are recorded in Table 6.

Table 6.
Sandy soils east of Green River, Grand County, Utah, near Elgin.

Depth of sample	Description of soil	Water soluble salts	Calcium sulphate	Sodium carbonate	Sodium chloride	Sodium sulphate	Nitric nitrogen P. P. M.
1	Characteristic peach orchard soil	0.10	0.05	0.03	0.01		2.4
2	" "	0.20	0.13	0.03	0.01	0.01	2.0
3	" "	0.33	0.14	0.04	0.06	0.04	4.0
4	" "	0.51	0.11	0.04	0.06	0.24	4.0
5	" "	0.89	0.66	0.02	0.01	0.06	2.0

These soils are markedly free from injurious water soluble salts and the greater portion of the water soluble material present consists of gypsum. The soils likewise more nearly represent normal arid soils in their nitric nitrogen content, containing, as they do, from 2 to 4 parts of nitric nitrogen per million.

¹) Utah Experm. Stat. Bull. No. 111.

Near this point the Green River has cut through the sandstone into the Mancos shale which lies beneath, thus enabling the investigator to obtain samples of the sandstone and underlying shale, together with the accumulation of salts from these strata. The analytical results are recorded in Table 7.

Table 7.
Soil forming material east of Green River, Grand County, near Elgin.

Description of sample	Water soluble salts	Calcium sulphate	Sodium carbonate	Sodium chloride	Sodium sulphate	Sodium nitrate	Nitric nitrogen P. P. M.
Sample salts on bank of river	37.80	1.08	0.03	5.06	30.98	0.11	180.0
Decomposing sandstone . .	0.56	0.11	0.32	0.16	0.27		29.0
Decomposing sandstone . .	1.59	0.61	0.02	0.31	0.56		30.0
Shale material under sand .	1.93	0.71	0.02	0.24	0.82	0.05	75.0
Crust from ditch	10.83	0.16	0.13	1.11	8.98	0.20	334.0

These results indicate that the water soluble salts are rich in nitric nitrogen and also indicate quite clearly that the nitric nitrogen occurring in the soil has its origin to a large extent in the underlying decomposing sandstone and shale.

About 50 miles north-west of Green River a new irrigation project is just being promoted. An examination of the virgin soil of this section showed that the surface soil contained only very slight traces of water soluble salts in the surface soil and from 1 to 2 parts per million of nitric nitrogen. At a depth of six feet the water soluble salt content was 0.46 per cent, of which 0.42 per cent was calcium sulphate and 0.04 per cent sodium chloride, while the nitric nitrogen content was only 1.4 p. p. m. At a depth of 22 feet, after passing through over ten feet of undecomposed shale, the water soluble salt content was 2.22 per cent, of which 0.94 per cent was calcium sulphate, 1.18 per cent was sodium sulphate, and 0.03 per cent sodium chloride, while the nitric nitrogen content was 22.4 p. p. m. The climate in this section of the State is extremely arid, the rainfall is probably not over 7 inches per annum. These water soluble salts in this position in a virgin soil could only be of marine origin. It is important to note that nitric nitrogen is over twenty times greater than in the surface. It could not be conceived of as having been formed at the present time. The soil is very deficient in organic matter. It contains only 0.014 per cent organic nitrogen. There is very little organic nitrogen to be nitrified while there is not sufficient organic matter to furnish the energy to support the bacterial life necessary to produce the nitrates.

These facts, together with the utter lack of the moisture necessary for bacterial action, and the inability of the nitrates to be moved to their present position owing to the absence of the moisture medium, clearly indicate that the nitrates are of remote origin.

The Book Cliffs form the southern boundary of the Uintah Basin, and the soil of the basin is formed from material similar to that which composes the Book Cliffs. Since the opening of this section to settlement, in 1905, there have been hundreds of thousands of acres of land brought under cultivation. Since the soil formed from the weathering of the Book Cliffs on

the south is susceptible to nitrate accumulations, it seemed probable that the soil of the Uintah Basin would be similarly susceptible. An examination of the alkali material of this section in 1911 confirmed this view. Three samples of material were obtained: No. 1 is a sample of the surface soil, containing the characteristic black incrustation; No. 2 is a sample of the white salts picked up on a ditch bank which is devoid of any vegetation; No. 3 is a sample of white material oozing out at the base of a piece of upland soil. The salts obtained were picked up at the edge of an alkali spring, due, no doubt, to seepage water from an irrigating ditch on the upland soil. The results obtained in an analysis of the water soluble material are recorded in Table 8.

Table 8.
Composition of Alkali Salts in Uintah Basin.

Sample No.	Description of sample	Total water soluble salts	Calcium sulphate	Sodium carbonate	Sodium chloride	Sodium sulphate	Nitric nitrogen P. P. M.
1	Black soil	2.56	0.98	0.38	0.39	0.95	280
2	White alkali	84.78	1.60	0.36	5.19	76.30	544
3	White salts base of uplands	89.78	3.20	0.36	1.31	83.17	3360

This alkali material is exceptionally rich in nitrates. No. 3, which represents the drainage from the uplands, especially is of interest as it indicates clearly that the nitrates are of marine origin.

Table 9.
Composition of Utah County Soil.

	Surface layer	Clay layer, depth of 4 feet	Sand layer
Total soluble salts	1.51	3.02	3.51
Sodium carbonate	0.039	0.029	0.053
Sodium chloride	0.600	2.00	0.82
Calcium carbonate	0.021	0.014	None
Magnesium carbonate	0.008	0.016	None
Sodium nitrate	0.135	0.042	0.003
Calcium sulphate	0.48	0.88	2.38
Magnesium sulphate	None	None	0.182
Nitric nitrogen P. P. M.	225	70	0.5

In Utah County, in an entirely different kind of soil lying in the Great Basin formed at the time of Lake Bonneville, similar results were obtained. This soil is west of Utah Lake and supported a native desert growth of shad scale and grease wood. At the time of the examination the soil had just been broken up and planted to an apple orchard. The soil consisted of a heavy clay layer extending to a depth of about four feet underlaid by a coarse sand layer of varying depth. The soil has a gentle slope to the east toward the lake. Three samples of this material were submitted to analysis: a sample of the loose surface soil to a depth of probably one inch, a sample of the clay layer, and one of the underlying sand.

These results indicate a marked accumulation of nitrates in the surface soil. The accumulations of water soluble salts containing nitrates in the clay layer clearly indicates the source of the alkali and also the nitrates.

In 1905, a careful examination of the soils of the Southern Utah Experimental Farm was made. A critical examination of the results of this analysis will be made elsewhere. The chemical composition of the water soluble salts is indicated in Table 10. While this soil contains a high water soluble salt content, it would not be regarded as a dangerous alkali soil, owing to the fact that over 80 per cent of the water soluble material is gypsum. It is significant that the nitrogen content of this soil is very high and that there is almost twice as much nitric nitrogen in the tenth foot as in the first foot: as a result of a large number of determinations the total organic nitrogen content was found to be only 0.028 per cent.

Table 10.
Soils of the Southern Utah Experimental Farm. 1905.
Composition of the water soluble salts.

Depth of sample		Total ¹⁾ salts	Hydrated calcium sulphate	Sodium chloride	Sodium carbonate	Sodium and potassium sulphates	Nitric nitrogen P. P. M.
1	Average of 40 determinations	1.55	1.34	0.043	0.052	0.193	22.0
3	" "	2.67	2.41	0.037	0.052	0.122	14.0
5	" "	2.68	2.43	0.033	0.075	0.148	27.5
10	" "	2.85	2.47	0.038	0.097	0.120	38.0

In 1910, five years later, a second examination was made of the soil of this farm. The results obtained are recorded in Table 11. Again, there is a high soluble content which consists largely of gypsum. There is a marked accumulation of nitric nitrogen in the fourth foot. Two samples of the

Table 11.
Soils of the Southern Utah Experimental Farm. 1910.
Composition of water salts.

Depth of sample	Description of sample	Total ²⁾ salts	Calcium sulphate	Sodium chloride	Sodium carbonate	Sodium sulphate	Nitric nitrogen P. P. M.
1	Average of 9 determinations	0.71	0.47	0.058	0.040	0.121	19.0
2	" "	1.65	1.27	0.041	0.041	0.226	6.0
3	" "	2.39	1.85	0.074	0.029	0.051	5.5
4	One determination	2.73	2.01	0.07	0.018	0.37	22.9
5	" "	3.14	1.83	0.106	0.011	1.29	9.9
6	" "	2.86	1.63	0.095	0.018	0.18	56.1
Surface	Hard crust	13.70	4.68	7.69	0.021		1132.0
Surface	Mealy soil underneath crust	6.59	3.09	2.89	0.029		1298.0
1	Bad lands	5.08	1.30	1.24	0.026	1.72	599.0

¹⁾ Includes water of hydration in calcium sulphate.

²⁾ Does not include water hydration of calcium sulphate.

water soluble salt accumulation on the surface were secured. One of these samples was a hard crust, the other the mealy soil lying underneath the crust. The crust apparently is due to the presence of excessive quantities of gypsum. Both samples are remarkably rich in nitric nitrogen. The mealy portion contains less gypsum and sodium chloride but slightly more nitric nitrogen. It is markedly significant that there are nitrate accumulations in the lower depths of this soil and that the total water soluble salts and nitric nitrogen also increase with depth, indicating a common marine origin. The characteristic "bad lands" of this section are rich in nitric nitrogen, the first foot of a representative section containing 599.0 parts per million of nitric nitrogen. It is thus seen that in this soil, containing less than 0.04 per cent of sodium chloride to a depth of ten feet in 1905, that there has been an accumulation of 7.69 per cent at the surface in spots by 1910. It certainly would be regarded as folly to attempt any other explanation of this accumulation of sodium chloride than by concentration from the lower depth. Will not the same explanation account for the accumulation of the 1132 parts per million of nitric nitrogen, especially when it is remembered that in 1905 the nitric nitrogen content increased with depth until there was nearly twice as much in the tenth foot as in the first, while the sodium chloride remained practically constant with depth. Is it necessary to assume rapid nitrogen fixation at the present time?

Table 12.

Nitric nitrogen content of alkali-free soils and of soil containing alkali. Results reported as parts per million of nitric nitrogen.

No.	Soils free from "alkali"	P. P. M	No.	Soil containing "Alkali"	P. P. M.
1	Rothamsted soil, after fallow, 1883	1.3	1	Typical shale soil, Green River, Utah	10.0
2	Rothamsted soil, after clover, 1883	2.2	2	$\frac{1}{8}$ inch crust, soil Green River, Utah	12.0
3	Rothamsted soil, Bokara clover, 1882	1.3	3	Loose salts	2000.0
4	Rothamsted soil, vetches	3.8	4	Shale soil	42.0
5	" " lucern	3.3	5	"Dead soil", Green River	18.0
6	" " wheat	4.3	6	Decomposing shale	354.0
7	Utah irrigated alfalfa	0.8	7	Decomposing sandstone	30.0
8	" " potatoes	1.8	8	White alkali, Uintah Basin	3360.0
9	" " oats	1.5	9	Black soil, " "	280.0
10	" " corn	1.5	10	Virgin soil in Utah Co. "	225.0
11	" " fallow	5.4	11	1st foot, So. Ut. Ex. Farm	22.0
12	" dry farming, wheat	0.8	12	10th foot, So. Ut. Ex. Farm 1905	38.0
13	" " virgin	1.0	13	Southern Ut. Exp. Farm 1910	1298.0
14	" " alfalfa	1.8	14	Bad lands of Dixie	599.0

In order to bring clearly to mind the discussion in the preceding pages, Table 12 has been constructed from the data already presented. This table shows the nitric nitrogen content of normal soils free from alkali under both humid and arid conditions and also the nitric nitrogen content of characteristic alkali soils and of the alkali accumulations. In the normal soils free from alkali in no case does the nitric nitrogen exceed 6 parts per million, while in the alkali soils there is never less than 10 parts per million and in one case the amount rises to 3360 parts per million.

Bacterial action in arid soils in the past, owing to the limiting moisture factor, may not have been very great, but certainly there must have been a definite amount of nitrification taking place. The accumulation of alkali in the soils indicates plainly that the nitrates could not have been lost by drainage. The meagre growth of desert vegetation and the fact that little of this was removed, prevents the possibility of the loss of much of the nitric nitrogen in this way. It seems clearly possible, then, that the alkali accumulations of the arid West should be accompanied by soluble nitrates formed by slow nitrification during the remote past. And there is no more reason to assume that the accumulations of nitrates in our arid alkali soils indicates rapid bacterial action at the present than there is to assume that the chlorides and sulphates in alkali soils are of recent origin.

The Significance of the Nitrate Accumulations.

Aside from the possibility of injury to vegetation, the nitrate accumulations are of especial significance from other points of view. The results reported indicate quite clearly that the present nitrate accumulations are due in a large measure to the nitrates formed during the remote past and deposited either from the evaporation of sea water or else carried to lower depths in the soil by the limited amount of rainfall. This conception fully accounts for a number of observed facts. Thus, it is well known that alkali land a year or two previous to "going bad" gives an exceptional yield of produce of very luxuriant growth. The movement of the nitrates, together with the other alkali salts, from lower depths to the feeding ranges of the plant roots readily explains this phenomenon, the abundant supply of nitric nitrogen giving rise to a corresponding luxuriant growth.

Hilgard¹⁾, in a number of papers, has called attention to the fact that arid soils have a low organic nitrogen content and yet do not respond readily to nitrogen fertilization. He has attempted to explain this by the fact that while the humus content of arid soils is very low it is much richer in nitrogen than is the humus of humid soils, but this explanation does not appeal to a number of investigators. It is difficult to conceive how the humus of arid soils being exceptionally rich in nitrogen can make a small quantity of such nitrogen equivalent to the much larger quantity contained in the humid soils. Such a soil, for example, as the Southern Utah Experimental Farm, would contain only 560 pounds of organic nitrogen in the ploughed surface soil, which would last for the maximum production of a 20 ton crop of sugar beets for less than six years, while a humid soil containing 0.4 of 1 per cent of organic nitrogen would contain 8,000 pounds of nitrogen per ploughed surface, sufficient for a 20 ton crop of sugar beets for eighty years. The fact that six crops of sugar beets would completely exhaust this arid soil of its organic nitrogen, while the organic nitrogen of humid soils would supply nitrogen for the same crop for eighty years makes Hilgard's view untenable. Yet with respect to this question Hilgard¹⁾ says: "Another point of interest in connection with the supply of soil-nitrogen in any regions has lately been developed by the work of the Station. It having been observed that the light sandy or powdery soils, so characteristic of our fruit-growing mesas, are very poorly supplied with humus, the natural inference was that when these otherwise rich soils began

¹⁾ California Sta. Report for 1893—94. p. 66—70.

to fall short in production, nitrogenous fertilizers were first in order. The recommendations made accordingly having in a number of cases failed to produce a satisfactory result, the cause was sought for. Investigation revealed the entirely new fact that humus of the arid soils contains on the average more than three times as much nitrogen as does that of the region of summer rains; and that, therefore, the supply of soil nitrogen is very nearly the same in bot regions.

"We may at the same time congratulate ourselves upon the extraordinary fund of fertility existing in such lands, which seems to postpone indefinitely the necessity of the replacement of nitrogen with-drawn by crops. For what is contained in the first foot of soil is but a portion of what we may fairly presume to be present in the entire soil mass reached by the tap-roots of the beet; and at the same time, the supply is being constantly replenished by natural process." The fact that humus in arid soils is richer in nitrogen simply indicates that the organic matter is in a more advanced stage of decomposition. In the decomposition of the organic matter in arid soils the carbon is lost at a far greater rate than is the nitrogen, thus giving rise to a closer carbon-nitrogen ratio, as has already been clearly demonstrated¹⁾. This failure of Hilgard's hypothesis to account for the observed fact leaves the question open for a new explanation. The occurrence of nitrates in our arid soils, arising from the marine deposits, or the accumulation in lower depths due to the slow nitrification during the past geological ages and the failure of the limiting rainfall to remove them, readily accounts for the fact observed by Hilgard. The application of irrigation water furnishes a proper medium for the upward movement of the water soluble salts, including the nitrates. This upward movement of the nitrates accounts, in a large measure, for the nitrogen removed by the crops, and explains why arid soils apparently deficient in nitrogen are enabled to produce such luxuriant crops on the application of irrigation water. Thus, with the soil of the Southern Utah Experiment Farm, as noted above, it may be readily understood why such a soil so poor in organic nitrogen can produce crops when it is noted that the nitrates increase with depth until there is nearly twice the amount in the tenth foot as in the first, and when it is further observed that these nitrates do rise to the surface, as indicated.

A clear conception of the method of nitrate accumulations in arid soils offers a ready explanation of how certain dry-farm soils²⁾ which have been cropped for forty years, or more, are richer in organic nitrogen than are the adjacent virgin soils. The slow formation of nitrates during the past ages and their tendency to accumulate in the lower subsoil offers a ready explanation of this fact. When such arid soils are subjected to cultivation the deeper rooted plants of an arid region feed to a certain extent upon these nitrates formed during the past ages. The plant uses this source of nitrogen to form organic nitrogen, and on harvesting the straw is added to the surface soil, thus increasing the organic nitrogen content of the surface soil at the expense of the nitric nitrogen of the under soil.

Conclusions.

The common conception that nitrification takes place with great intensity in arid climates rests primarily upon

¹⁾ Stewart, Illinois Exp. Sta. Bull. No. 145.

²⁾ Stewart, Utah Experim. Stat. Bull. No. 109. 1910.

the observed fact that nitrates tend to accumulate in great quantities in certain arid soils.

These nitrate accumulations always occur in connection with other water soluble salts, such as sodium chloride and gypsum. No nitrate accumulations have been observed in arid soils free from other water soluble salts. The alkali salts must therefore be intimately associated with the nitrates in one of two ways: 1st, they must exert a markedly favorable influence upon nitrification; or 2nd, the nitrates, like the other alkali salts, are of remote origin. From the data presented, it would appear that the latter conception is the correct explanation.

The nature of the material out of which many of the soils of Utah and Colorado are formed indicates clearly that the nitrate accumulations found in these soils are undoubtedly of marine origin.

The alkali occurring in many soils of Utah is undoubtedly, in a large measure, of marine origin, being deposited at the time of the formation of the shale; and, on the decomposition of this shale in the formation of the soil, the alkali has become incorporated with the latter. The passage of the water through the shale structure also washed out the soluble salts and carried them to the lower lying land.

The presence of the nitrates in the alkali soils of the arid sections, in addition to the possibility of injury arising therefrom, is of significance from other points of view. It is a well known fact that alkali soils a year or so before "going bad" produce a luxuriant growth of plants which may be accounted for by the movement of the nitrates up to the feeding range of the plants, while a year or so later the salts become so concentrated as to cause the death of the plants.

Arid soils are markedly poor in organic nitrogen and yet the crops produced are excellent. The soils are not "nitrogen hungry". Hilgard has attempted to account for this apparent anomaly by the assumption that since the small amount of humus in arid soils is relatively richer in nitrogen than is the humus in humid soils, this fully compensates for the apparent deficiency in nitrogen. An appreciation of the tendency of the nitrates, formed during the past ages, to accumulate in arid soils offers a better explanation of this fact, and is not open to the mathematical objection that has been raised against Hilgard's assumption.

There is no reason to assume that the accumulation of nitrates in arid alkali soil indicates a rapid bacterial action at the present time! These accumulations indicate a concentration of the nitrates already in the soil formed by slow bacterial action in the remote past. The application of the irrigation water has simply furnished a medium by which the nitrates may move, or be moved, from one place to another.

This source of nitrogen affords a clear explanation of the fact that in some cases the surface foot of cultivated arid dry-farm soils is richer in organic nitrogen than is the adjacent soils, as already indicated. The nitric nitrogen is obtained by the deep rooted plants from the subsoil, converted into organic nitrogen by the plant, and then, added to the surface soil by the plowing under of the straw.

Of course, it is fully realized that there is the possibility of ammonification, nitrification, and even nitrogen fixation taking place, to a certain extent, in some alkali soils at the present time, but it is evident from the data presented, that the great accumulations of nitrates found in many alkali soils is clearly of remote origin, being concentrated in their present position by the movement of the soil moisture.

Realizing fully that the term "alkali" must be so extended as to not only include the carbonates, chlorides and sulphates, but also the nitrates of the alkali metals, and recognizing clearly the source and method of nitrate accumulations in our arid alkali soils, we are in a position to work intelligently toward a solution of the problems presented by these unusual accumulations. The adoption of the methods of controlling the accumulations of alkali at the surface as suggested by Hilgard over twenty years ago, such as mulching, tillage and proper drainage, will convert the nitrate scourge into a blessing in disguise.

Chemical Laboratory, Utah Experiment Station, Logan, Utah,
August 1912.

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Kenntnis der niederen pflanzlichen Organismen, besonders der Bakterien, von Hoch- und Niedermoores in floristischer, morphologischer und physiologischer Beziehung.

Nachtrag von Dr. Georg Albert Ritter.

In meiner, in dieser Zeitschrift Bd. 34. 1912. No. 23/25 publizierten Arbeit habe ich in der Literaturübersicht eine Arbeit von Fabricius und H. v. Feilitzen zitiert, welche die Keimzahlen in jungfräulichen und bearbeiteten Mooren betrifft. Ich habe den beiden Autoren daselbst vorgeworfen, daß die Zählzeit zu kurz bemessen wäre, „so daß die bezüglichen Angaben nur einen beschränkten Wert beanspruchen dürfen“.

Herr H. v. Feilitzen hat in einer „kurzen Berichtigung“ in Bd. 36. 1912. p. 53/54 bereits dargetan, daß den Verfassern dieser Vorwurf zu Unrecht geschehen ist, und auch gezeigt, auf welche Weise bei mir der Irrtum entstand, durch eine Verwechslung der Autoren mit dem Verfasser einer von ihnen referierten Arbeit (Stålström: Finska Mooskulturföreningens årsbok. 1898. fr. 44—64).

Trotzdem möchte ich auch selbst nochmals auf diesen, mir sehr peinlichen und bedauerlichen Irrtum aufmerksam machen. Er kam zustande dadurch, daß ich zur Zeit, wo die fraglichen Zeilen niedergeschrieben wurden, weder die Originalarbeit, noch ein Referat zu meiner Verfügung hatte, sondern auf einige kurze, unvollständige bez. Notizen angewiesen war, die ich mir früher zu besonderem Zwecke zufällig gelegentlich machte.

Nachdruck verboten.

Über die Variabilität des *Bacillus solanacearum* Smith.

Von J. A. Honing, Medan, Sumatra.

Bei Untersuchungen des *Bacillus solanacearum*, die ich anstellte, um eine zuverlässige Differentialdiagnose zu finden, womit man diese Bakterie auch dann erkennen kann, wenn sie ihre Virulenz gegenüber Tabak verloren hat, z. B. in Bodenproben, zeigte sich eine ganz eigentümliche Variabilität in dem Wachstum in den verschiedenen Nährlösungen. Die Fälle, in welchen Wachstum in allen angelegten Kulturen ausnahmslos erfolgte, waren verhältnismäßig selten. Mit den meisten Nährstoffkombinationen trat nur bei einem Teil der Kulturen sichtbares Wachstum ein.

Man ist geneigt, es als selbstverständlich zu betrachten, daß von 3 aus derselben Bouillonkultur geimpften Parallelkulturen entweder alle 3 gelingen oder keine einzige. So war auch, mit nur wenigen Ausnahmen, der Befund mit den Stoffen, welche zugleich Stickstoff- und Kohlenstoffquellen sein sollten, wie verschiedene Eiweißstoffe und die Ammoniumsalze organischer Säuren. Wenn aber Versuche angestellt wurden mit Stickstoffquellen, welche allein keine hinreichende Nahrung darboten, kombiniert mit Zuckerarten oder Alkoholen, so erhielt ich ganz andere Resultate: Sehr oft gelang nur eine oder zwei von den drei angelegten Kulturen mit derselben Nährlösung, die aus einem und demselben Reagensglas geimpft war.

Den Gedanken an Fehler, an zu alte, schon abgestorbene Kulturen oder an Fehler in der Technik beim Impfen mußte ich von vornherein aufgeben, weil so etwas niemals passierte beim Übertragen in Bouillon (bei gewiß weit über 200 Kulturen), in Peptonwasser (33 Kulturen), in Lösungen von Ammoniumsuccinat (32 Kulturen), Ammoniumlaktat (33 Kulturen), KNO_3 und Glukose (12 Kulturen), Asparagin mit Natriummalat (21 Kulturen) und Natriumsuccinat (21 Kulturen), womit ausnahmslos immer Wachstum erfolgte.

Große Stammesunterschiede gab es in dieser Hinsicht auch nicht: 27 Stämme von *Bacillus solanacearum*, wovon 20 aus Tabak, 2 aus *Acalypha brehmerioides*, 1 aus *Ageratum conyzoides*, 1 aus *Synedrella nodiflora* und 3 aus *Tectona grandis*, variierten alle mehr oder weniger stark. In nachstehender Tabelle I sind die Resultate übersichtlich zusammengestellt.

In 2 Fällen gelang keine einzige von den 3 Kulturen. Das erste Mal beziehen die Zahlen sich nur auf Kulturen von Reihen, welche auch in den Gruppen mit Wachstum vorkommen, wie z. B. 1 Stamm aus Tabak, der mit KNO_3 und Rhamnose einen Mißerfolg lieferte, während andere Stämme, und auch derselbe Stamm nach Impfung in Tabak und darauf erfolgter Reinzucht aus demselben mit dieser Lösung etwa die Hälfte der Kulturen trübten.

Das zweite Mal sind nur Fälle mit immer negativem Erfolg zusammengezählt, wo kein einziger Stamm in der Lösung wachsen konnte, wie z. B. die 66 Kulturen mit KNO_3 und Lävulose, mithin nur die konstant negativen Resultate, welche außer Betracht bleiben können.

Tabelle I.
Von je drei angelegten Kulturen trat sichtbares Wachstum ein in:

Nährlösung	allen 3 Kult.	2 von den 3 Kult.	1 von den 3 Kult.	0 von den 3 Kult.	Niemals Wachstum
Pepton „Witte“	11×	—	—	—	—
Tyrosin	10×	1×	—	—	—
Ureum mit verschiedenen C-Quellen	25×	4×	2×	1×	—
Glykokoll mit verschiedenen C-Quellen	24×	14×	12×	10×	15×
Asparagin mit verschiedenen C-Quellen	76×	26×	23×	24×	54×
KNO_3 mit verschiedenen C-Quellen	130×	62×	47×	43×	88×
NH_3 mit verschiedenen C-Quellen	43×	2×	4×	7×	17×
Total	319×	109×	88×	85×	174×

Wenn man sich die Zahlen der Tabelle I ansieht (und dabei bedenkt, daß auch andere Kennzeichen sehr variabel sind, wie die Reduktion von Natriumselenit, die Indol-, Schwefelwasserstoff- und Farbstoffbildung), so wird man zugeben, daß *Bacillus solanacearum* ein schönes Beispiel von Variabilität liefert.

Öfters findet man in der Literatur die Behauptung, daß ganz kleine Unterschiede in der Zusammensetzung der Nährböden ein abweichendes Verhalten der Bakterien veranlassen können. Weil die Lösungen immer gekocht und filtriert werden, also homogen sind, bevor sie über die Reagensgläser verteilt werden, so bleibt nur die Möglichkeit übrig, an kleine Unterschiede in der Alkalität zu denken; vielleicht waren die Gläser vor dem Gebrauche mit Essigsäure ausgekocht worden. Ich habe immer gefunden, daß in Röhrchen mit sichtbarem Wachstum die ursprünglich schwach saure Lösung wenigstens neutral, bei kräftiger Entwicklung alkalisch (Indikator Lakmus) geworden war, während beim Ausbleiben des Wachstums der klare Inhalt immer noch schwach sauer reagierte. Auch dies machte Unterschiede in der Alkalität als Ursache der schwankenden Ergebnisse nicht wahrscheinlich.

Eine Meyersche Lösung mit 0,2 Proz. Glykokoll und 1 Proz. Glukose wurde nach Neutralisation über 5 Kolben verteilt, resp. es wurden $2\frac{1}{2}$ Proz. $\frac{1}{10}$ N. H_2SO_4 , $1\frac{1}{4}$ Proz. dito, nichts, $1\frac{1}{4}$ Proz. $\frac{1}{10}$ N. NaOH und $2\frac{1}{2}$ Proz. dito zugesetzt. In derselben Weise machte ich 5 Lösungen mit 1 Proz. Mannose statt Glukose. Die Lösungen mit Glykokoll haben vor anderen den Vorzug, daß die Kulturen so leicht auf ihre Reinheit hin zu prüfen sind, da *Bacillus solanacearum* bis jetzt nur mit Glykokoll Ketten bildet, welche zum Teil zu knäueförmigen, pilzähnlichen Gebilden vereinigt sind, und hier und da eigentümlich gequollene Zellen enthalten (nach dem Zurückimpfen in Bouillon wird das Bild wieder normal!).

Geimpft wurden jedesmal 3 Reagensgläser mit derselben Lösung mit 2 Stämmen aus *Acalypha boehmerioides*, wovon einer in Tabak geimpft und daraus wieder isoliert war, A₁ und A₂T, einem Stamm aus Tabak T₁ und später noch eine Mannose-Reihe mit A₁, nachdem auch dieser in Tabak geimpft und daraus isoliert war, A₁T, mit folgendem Resultat:

Tabelle II.

Wachstum von *Bacillus solanacearum* in Meyerscher Lösung mit 0,2% Glykokoll.

C-Quelle	Säuregrad, Alkalität	A ₁	A ₁ T	A ₂ T	T ₁
1% Glukose	2½% 1/10 N. H ₂ SO ₄	3	—	3	3
" "	1¼" " " "	3	—	3	3
" "	neutral	1	—	2	2 (von 2)
" "	1¼% 1/10 N. NaOH	2	—	1	3
" "	2½" " " "	2	—	0	2 (von 2)
" Mannose	2½" " " H ₂ SO ₄	0	3	3	3
" "	1¼" " " "	0	3	3	0
" "	neutral	0	3	3	3
" "	1¼% 1/10 N. NaOH	0	3	3	3
" "	2½" " " "	0	3	2	3

Aus der Glukosereihe von A₁ impfte ich aus einer gelungenen Kultur von jeder Lösung wieder drei Reagensgläser mit derselben Lösung. Alle 15 Kulturen zeigten Wachstum. Als auch aus den Röhrchen ohne Wachstum ebenfalls 3 neue Kulturen angelegt wurden, also 2 × 3 neutrale, 3 mit 1¼ Proz. 1/10 N. NaOH und 3 mit 2½ Proz. 1/10 N. NaOH, war das Resultat genau dasselbe, mit Ausnahme von einer Reihe mit neutraler Lösung. Diese war aus einer der beiden Kulturen geimpft worden, welche nach 11 Tagen noch ganz klar waren, und alle 3 Tochterkulturen trübten sich schon nach 5 Tagen. Die übrigen 9 Kulturen waren nach 48 Tagen noch unverändert.

Aus der Tabelle II ersieht man, daß ganz kleine Unterschiede in der Alkalität nicht immer ohne Einfluß auf das Wachstum sind. Deutlicher noch wird das Verhalten, wenn man auch die Zeit, nach welcher Wachstum sichtbar eintritt, berücksichtigt. Diese war für Stamm A₁ die folgende:

Tabelle III.

Stamm A₁ zeigte in Meyerscher Lösung mit 0,2% Glykokoll und 1% Glukose von je drei Kulturen sichtbares Wachstum:

Nach Tagen:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mit 2½% 1/10 N. H ₂ SO ₄	0	2	3	—	—	—	—	—	—	—
" 1¼" " " "	0	1	3	—	—	—	—	—	—	—
neutral	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
mit 1¼% 1/10 N. NaOH	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2
" 2½" " " "	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2

Wenn nur einmal eine Kultur gelungen ist, kann man, wie schon erwähnt, mit Erfolg neue Kulturen anfertigen, und für diese ist die Zeit auch kürzer (s. Tabelle IV).

Mit denselben Stämmen wurde nachgewiesen, daß Licht- und Temperaturunterschiede die wechselnden Resultate nicht veranlassen. Außer den

Tabelle IV.

Schnelligkeit des Wachstums von 3 Tochterkulturen in Glykokoll-Glukose-Lösung.

Säuregrad, Alkalität	Trübung der Mutterkulturen vom Stamm A ₁	Sichtbares Wachstum der Tochterkulturen nach Tagen:			
		1	2	3	4
2 1/2% 1/10 N. H ₂ SO ₄	nach 2 Tagen	0	2	3	—
1 1/4 „ „ „ „	„ 3 „	0	3	—	—
neutral „ 6 „	„ 6 „	0	3	—	—
1 1/4% 1/10 N. NaOH	„ 4 „	0	0	1	3
2 1/2 „ „ „ „	„ 7 „	0	0	3	—

Reihen mit Glykokoll wurden auch solche mit Asparagin und Kalinitrat als Stickstoff-, und Adonit, Erythrit, Galaktose, Inosit, Lävulose, Lichenin und Mannose als Kohlenstoff-Quellen hergestellt und ebenso wie die Glykokoll-Reihen im Dunkeln im Thermostat bei 36° C gehalten, wodurch jedoch keine Gleichheit erreicht wurde.

Tabelle V.

Von je 3 angelegten Kulturen zeigten sichtbares Wachstum:

Schwach saure Lösung von:	A ₁	A ₁ T	A ₂ T	T ₁	T ₂	Coli- ¹⁾ ähnliches Bacterium	Proteus- ²⁾ ähnliches Bacterium
Asparagin + Adonit	0	3	2	2	1	3	3
„ + Erythrit	0	2	3	3	2	3	3
„ + Galaktose	0	2	3	3	3	3	3
„ + Inosit	1	1	3	3	2	3	2
„ + Lävulose	0	1	0	0	3	3	2
„ + Lichenin	0	0	0	0	0	3	0
„ + Mannose	0	2	3	1	3	3	2
Kalinitrat + Adonit	1	1	1	2	0	0	0
„ + Erythrit	2	3	3	3	1	0	0
„ + Galaktose	1	3	3	3	3	3	3
„ + Inosit	3	2	3	3	3	3	3
„ + Lävulose	0	0	0	0	0	3	0
„ + Lichenin	0	0	0	0	0	3	0
„ + Mannose	3	3	3	2	0	3	3

Betrachtet man die Zahlen 0 und 3 als normal, so würden es 24 abnormale Fälle sein.

Das Coli-ähnliche Bacterium zeigte mit diesen 14 Lösungen keine Variabilität, was auch mit Glykokoll und Glukose oder Mannose, zusammen 30 Kulturen, nicht der Fall gewesen war. Bei dem Proteus-ähnlichen Bacterium fehlte dreimal eine Kultur, wie das auch mit saurer Glykokoll-Glukose-Lösung einmal vorgekommen ist.

Licht- und Temperaturunterschiede sind jedenfalls nicht die Ursache.

Nun war es auffällig, daß mit Glykokoll das Wachstum sich oft in Form kleiner Punkte auf den Glaswänden zeigte. Man konnte denken, daß ganz kleine Reste von Nährstoffen, z. B. Agarpartikelchen, zurückgeblieben wären und eben hinreichten, um das Wachstum vielleicht nur für eine oder sehr

¹⁾ Wird als Bacterium Schüffneri beschrieben werden.

²⁾ Wird als Bacterium deliensens beschrieben werden.

wenige Bakterien zu ermöglichen, wobei die Tochterzellen sich der Lösung allmählich „anpassen“ würden. Darum wurde ein Teil der Reagensgläser nach der gewohnten Reinigung noch einige Tage lang mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat behandelt. Die Zahl der gelungenen Kulturen war jedoch genau dieselbe als mit den nicht extragereinigten Röhrchen; in beiden Fällen 21 von den 24 angelegten Kulturen.

Tabelle VI.

Vergleichung des Wachstums von je 2 Kulturen in den in gewohnter Weise gereinigten Reagensgläsern (a) und in den noch extra mit H_2SO_4 und $K_2Cr_2O_7$ gereinigten (b).

Schwach saure Lösung von Glykokoll mit	Stamm T_1		Stamm T_3		Stamm A_1T	
	a	b	a	b	a	b
Dulcit	2	2	1	2	2	2
Galaktose	2	2	2	2	2	2
Mannit	2	2	2	2	0	0
Sorbit	2	2	2	2	2	1
Total	8	8	7	8	6	5

Gegenüber allen diesen erfolglosen Versuchen, welche äußeren Umständen zuzuschreiben sind, stehen andere, woraus es sich zeigt, daß man die Ursache bei dem Bacterium selbst zu suchen hat; mehr Impfmaterial erhöht die Anzahl der Kulturen mit sichtbarem Wachstum und beschränkt die Zeit, nach welcher das Wachstum zu konstatieren ist, wie solches der folgende Versuch uns lehrt.

Zu gleicher Zeit wurden 2 Reihen Glykokoll-Glukose-Kulturen angefertigt, von denen die eine geimpft war mit einer kleinen Öse (durchschnittlich 2,34 mm), die andere mit einer großen (durchschnittlich 12,14 mm) aus einer Bouillonkultur des *Acalypha*-Stammes A_1T . Obwohl mit der größeren Öse die übertragene Menge wenig mehr als fünfmal so groß war, so war doch ein deutlicher Unterschied vorhanden.

Tabelle VII.

Wachstum des Stammes A_1T mit Glykokoll-Glukose in Meyerscher Lösung nach Impfung mit kleiner Öse (kl.) und großer Öse (gr.).

Glykokoll-Glukose-Lösung	2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		6. Tag		10. Tag	
	kl.	gr.	kl.	gr.	kl.	gr.	kl.	gr.	kl.	gr.	kl.	gr.
$2\frac{1}{2}\%$ n/10 H_2SO_4	0	0	0	0	1	2	1	2	2	2	3	2
$1\frac{1}{4}\%$ „ „	0	0	0	3	1	3	1	3	3	3	3	3
neutral	0	0	0	2	1	3	1	3	2	3	2	3
$1\frac{1}{4}\%$ n/10 NaOH	0	0	0	3	0	3	0	3	0	3	1	3
$2\frac{1}{2}\%$ „ „	0	0	0	1	0	2	0	3	0	3	0	3
Total	0	0	0	9	3	13	3	14	7	14	9	14

Mit neutraler Asparaginslösung und mit Glykokoll, KNO_3 oder Ureum und Glukose oder Mannose war ebenfalls die Anzahl der Kulturen mit Wachstum etwas niedriger nach Impfung mit der kleinen als mit der großen Öse, wie Tabelle VIII zeigt.]

Tabelle VIII.

Wachstum mit Asparagin, Glykokoll, KNO_3 oder Ureum nach Impfung mit der kleinen (kl.) und mit der großen (gr.) Öse.

Anzahl Kulturen	T_4		T_0		D^*_1		D^*_{1T}		Total	
	kl.	gr.	kl.	gr.	kl.	gr.	kl.	gr.	kl.	gr.
Angelegt	9	9	18	18	9	9	9	9	45	45
Wit Wachstum	7	8	4	10	7	8	3	5	21	31

*) D, Stamm aus Djatti, *Tectona grandis*.

Daß wirklich die größere Bakterienmasse und nicht das größere Quantum mitübertragener Peptonbouillon mehr Wachstum veranlaßt, steht darum fest, weil die Stämme T_5 und D_{1T} geimpft waren als Aufschwemmungen, die von Agarkulturen hergestellt waren. Und auch das Zusetzen von Bouillontropfen zu Kulturen, die mit einer geringeren Anzahl von Bakterien geimpft waren, ändert das Resultat nicht; wenn es kein Wachstum gibt ohne Bouillon, gibt es auch keines, wenn ebensoviel sterile Bouillon jedem Röhrchen zugegeben wird, als sonst mit der großen Öse aus Bouillonkulturen übertragen wird.

Tabelle IX.

Wachstum des Stammes D_3 mit neutraler Glykokoll-Glukose-Lösung.

Anzahl Kulturen	Kleine Öse aus Bouillonkultur	Kleine Öse aus Verdünnung 1 : 4000	Kleine Öse aus Verdünnung 1 : 4000 mit großer Öse Bouillon
Angefertigt	4	5	5
Mit Wachstum	3	1*	0

*) Erst nach 25 Tagen hatte eine Kultur angefangen zu wachsen.

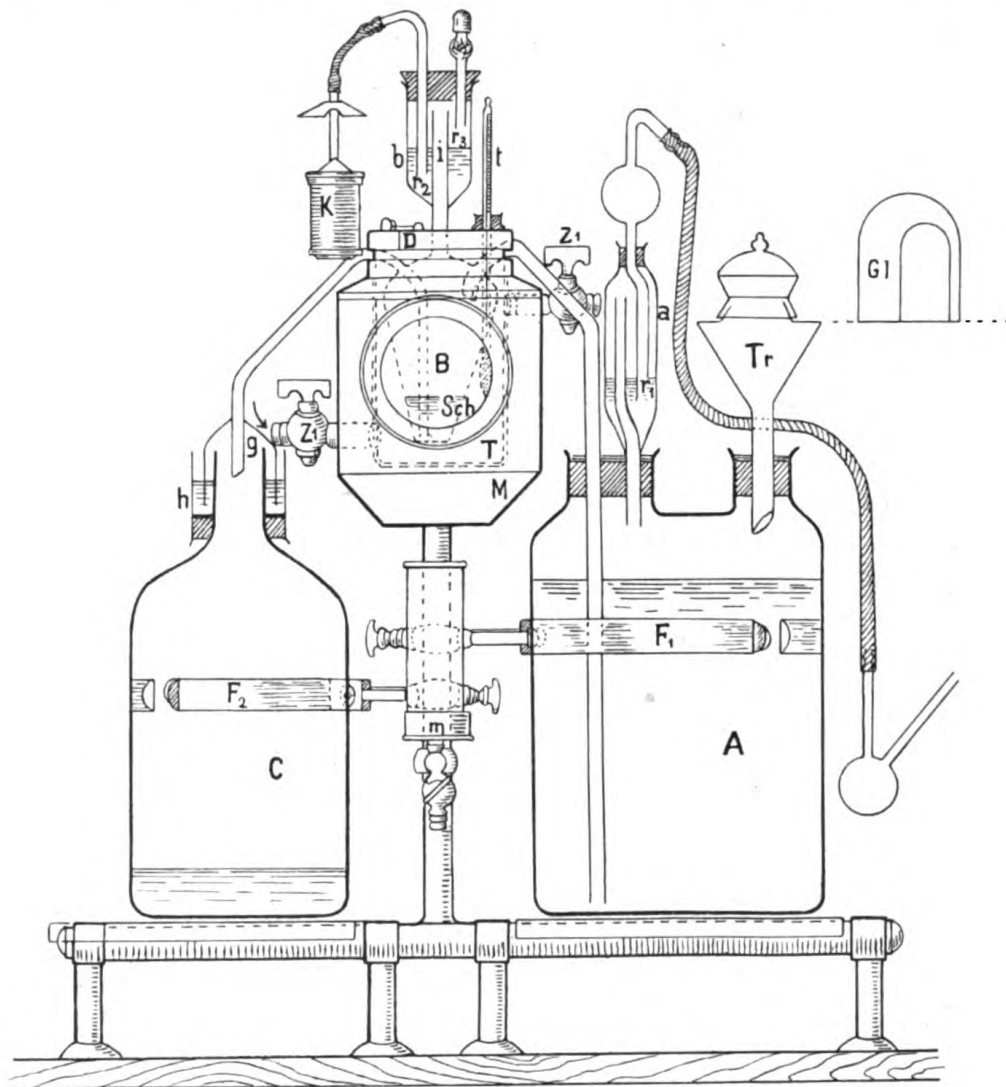
Tabelle X.

Wachstum des Stammes D_3 mit neutraler Glykokoll-Glukose-Lösung; jedesmal 10 Röhrchen.

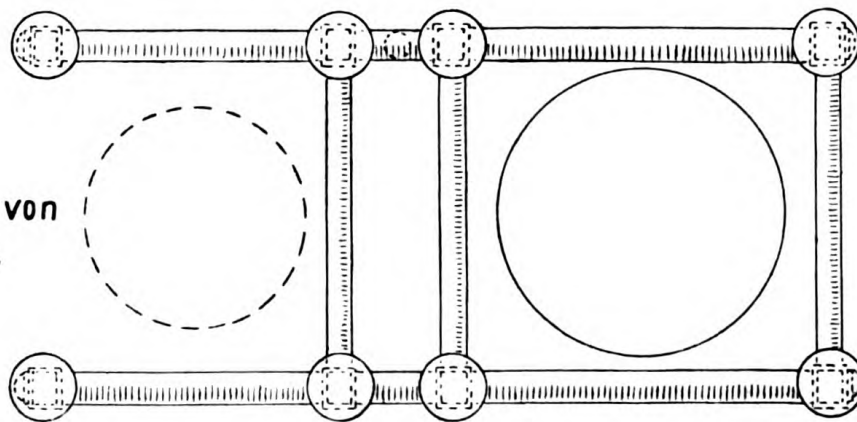
Wachstum nach	Anzahl Bakterien, womit geimpft wurde:			
	300	3 000	30 000	2 400 000
6 Tagen	0	0	1	10
10 „	0	1	4	10
15 „	0	1	9	10
20 „	0	1	10	10

Man kann diese Resultate vergleichen mit denen von Regenstein¹⁾, der dadurch, daß er größere Quantitäten Impfmateriel verwendete, Wachstum in Bouillon mit Sublimat erhielt, wo dies mit kleineren Bakterienmengen bei gleicher Konzentration des Giftes nicht gelingen wollte. Statt guter Nahrung, die mit einem Gifte kombiniert war, wurde dem *Bacillus solanacearum* offenbar weniger gute Nahrung dargeboten, womit von sehr vielen Individuen nur wenige sich zu entwickeln vermögen.

¹⁾ Regenstein, H., Studien über die Anpassung von Bakterien an Desinfektionsmittel. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 63. 1912. p. 281.)



Stativ von
unten.



Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Soll man nun diese wenigen Individuen als *Mutanten* betrachten, oder stellen sie *extreme Varianten* dar, ist also die Form der Variabilität die *Fluktuation*¹⁾, die *Modifikation*²⁾

Wenn wirklich eine neue Eigenschaft entstehen muß, um mit den in Tabelle I genannten Stoffen und den zahlreichen Kohlenstoffquellen (Arabiose, Glukose, Lävulose, Mannose, Galaktose, Erythrit, Adonit, Sorbit, Sorbin, Mannit, Dulcit, Rhamnose, Saccharose, Maltose, Laktose, Raffinose, Quercit, Inosit, Dextrin, Glykogen, Inulin, Lichenin, Glycerin, Natriumacetat, -butyrat, -citrat, -laktat, -malat und -succinat) wachsen zu können, so hätte *Bac. solanacearum* schon viele Mutationen geliefert, und würde wahrscheinlich noch viele andere zeigen, wenn man nur mit mehr Stickstoff- und Kohlenstoffquellen neue Versuche anstellte. Allerdings hat eine große Anzahl neuer Formen aus einer Bakterienart nach den Untersuchungen von Beijerinck³⁾ und Wolf⁴⁾ nichts Befremdendes mehr. Der Umstand, daß die 27 untersuchten Stämme, die aus kranken Pflanzen verschiedener Art und von Orten isoliert wurden, welche zum Teil über 100 km voneinander entfernt sind, alle dieselben Variationen zeigen, steht in völliger Übereinstimmung mit dem Verhalten der Mutanten liefernden *Prodigosus* stämme Beijerincks. Von schädlichen Absonderungsprodukten, welche Mutationen auslösen, kann nicht die Rede sein, um so mehr aber von Erschöpfungszuständen, weil das Bacterium in der Kultur aussterben muß, wenn es nicht einem Teil der Individuen gelingt, den neu dargebotenen Nährstoff zu verarbeiten. Und weil das Wachstum verhältnismäßig rasch sichtbar wird, wenn es nur erst angefangen hat, d. h. binnen 2 bis 4 Tagen (siehe die Tabelle IV), aber sonst oft 2 bis 3 Wochen ausbleiben kann, um schließlich dennoch aufzutreten, muß man annehmen, daß die Bakterien bisweilen tage-, ja sogar wochenlang hungern, bevor sie zu wachsen anfangen, mithin sich in Erschöpfungszuständen befinden. Erst wenn sie die Fähigkeit erlangt haben, die Stickstoff- und Kohlenstoffquellen beide anzugreifen, wofür in gewissen Fällen vielleicht zwei neu zu erwerbende Eigenschaften nötig wären, kann Wachstum erfolgen.

Wenn man in solchen Fällen statt von einer Mutation mit Pringsheim⁵⁾ von einer „*Anpassung*“ reden will, so ist das nur ein anderes Wort verwenden. Die Frage ist nur, ist ein neues Enzym entstanden, also eine neue Eigenschaft?

Sehr wahrscheinlich ist *Bacillus solanacearum* einem Teile der genannten Kohlenstoffquellen schon zuvor begegnet, z. B. Glukose und Apfelsäure⁶⁾, welche im Tabak vorkommt, und von den N-Quellen vielleicht wohl Asparagin (man denke an die Leguminosen, welche von ihm befallen werden können, während das Asparagin auch bei Pflanzen von anderen Familien gefunden ist), und gewiß Ammoniak- und Nitratstickstoff. Unmöglich ist es also, was diese Stoffe angeht, nicht, daß ein latentes Vermögen unter dem Reize des aufs neue dargebotenen Stoffes wieder aktiv wurde,

¹⁾ de Vries, H., Die Mutationstheorie. I. p. 37.

²⁾ Baur, E., Einführung in die experimentelle Vererbungslehre. p. 191.

³⁾ Beijerinck, M. W., Mutationen bei Mikroben. (Folia microbiol. I. 1912. 1.)

⁴⁾ Wolf, F., Über Modifikationen und experimentell ausgelöste Mutationen von *Bacillus prodigosus* und anderen Schyzophyten. (Ztschr. f. ind. Abstamm. u. Vererb. Bd. II. 1909. p. 90.)

⁵⁾ Pringsheim, H., Die Variabilität niederer Organismen. 1910.

⁶⁾ Czapek, Biochemie d. Pflanzen. II. p. 429.

wie Burri¹⁾ es sich vorstellt für *Bacterium coli mutabile* gegenüber Laktose und für *Bacterium imperfectum* gegenüber Saccharose. Ein Botaniker, welcher der Terminologie von de Vries folgt, würde alsdann von *degressiver Mutation*²⁾ reden. Ob *Bacillus solanacearum* solch ein latentes Vermögen hat, für alle 23 (von den 28) Stoffen, womit immer nur ein Teil der angefertigten Kulturen gelingt, wird aber niemand sofort bejahen wollen, obwohl es sicher ist, daß eine große Anzahl davon Pflanzenarten dann und wann zur Nahrung dient (bis jetzt habe ich die Virulenz gegenüber 15 Arten von 5 Familien festgestellt³⁾), und wahrscheinlich gibt es noch mehr).

Eines darf man jedoch nicht übersehen, nämlich die Umstände, unter welchen der *Bacillus solanacearum* eine der genannten Zuckerarten, Alkohole oder organische Säuren spaltet, sind ganz verschieden von denen für die *Prodigosus* mutanten Beijerincks oder Burris *Bacterium coli mutabile* und *Bact. imperfectum*. Für diese gab es keinen „Zwang“ zur Mutation; *Bac. prodigosus* konnte auch ohne Farbstoff- oder Schleimbildung wachsen und *Bact. coli mutabile* und *Bact. imperfectum* konnten ohne Laktose oder Saccharose, nur mit Pepton, sich ebenfalls gut entwickeln, während es für *Bac. solanacearum* unumgänglich notwendig ist, die Kohlenstoffquelle anzugreifen; es geht ums Leben. Man könnte sich vorstellen, daß der Reiz zur Mutation oder Anpassung unter solchen Umständen viel stärker, die Aussicht auf neue oder aktivierte Eigenschaften größer sein wird.

Für *Bac. solanacearum* sind die auf diese Weise erhaltenen Eigenschaften jedoch nicht dauerhaft (das Wort erblich will ich für Bakterien lieber vermeiden), denn nach Impfung in Tabak und darauf erfolgter Reinzucht eines *Acalypha*-Stammes, A₁T, zeigte es sich, daß er die Glukose ganz „vergessen“ hatte, und wohl mit Glykokoll und Dulcit (4 Kulturen), Galaktose (4 Kulturen) oder Sorbit (3 von den 4 Kulturen) wachsen konnte, nicht aber mit Glykokoll und Glukose (2 Kulturen), obwohl doch eine Glykokoll-Glukose-Kultur für die Impfung in Tabak verwendet worden war. Von 2 Stämmen aus Tabak „erinnerte“ der eine sich nachher nicht mehr genügend daran, daß er zuvor Saccharose vergoren hatte, und der andere konnte nicht mehr in allen Kulturen Mannit spalten, obwohl eine Mannit-Kultur zur Impfung in den Tabak gedient hatte. Mit einem Worte, beide Stämme standen der Saccharose und dem Mannit ganz so gegenüber wie zum erstenmal, als sie mit diesen Stoffen zusammengebracht wurden.

Daß die Merkmale nicht konstant sind, ist Anlaß genug, nicht von Mutationen zu reden. Der Ausdruck *Modifikation* ist für dergleichen Verhältnisse jetzt in der Bakteriologie der üblichere.

Der Hauptunterschied zwischen Mutationen und Modifikationen liegt in dem Konstant oder nicht Konstantsein der neuen Eigenschaften bei den Nachkommen. Ob jedoch in der Entstehungsweise ein essentieller Unterschied vorhanden ist, ist eine andere Frage. Wolf⁴⁾ erhielt z. B. mit Chromatzusatz sowohl Mutationen als Modifikationen von *Bacillus prodigiosus*.

¹⁾ Burri, Über scheinbar plötzliche Neuerwerbung eines bestimmten Gärungsvermögens durch Bakterien der Coligruppe. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. 1911. p. 321.)

²⁾ de Vries, l. c. I. p. 461.

³⁾ Recueil trav. botan. Néerland. Vol. 9. 1912.

⁴⁾ Wolf, l. c. p. 130.

giosus. Unmöglich wäre es gewiß nicht, daß Modifikationen und Mutationen in statu nascendi völlig übereinstimmen, während andere Faktoren über die Konstanz entscheiden.

Bei der Vergleichung des Verhaltens des *Bac. solanacearum* mit dem des *Bact. coli mutabile* und des *Bact. imperfectum* ist noch ein zweiter Unterschied sehr auffällig: Für *Bac. solanacearum* ist ein großes Quantum Impfmateriel unbedingt nötig, nur eine sehr geringe Anzahl Individuen, ein einziges unter vielen Tausenden, ist imstande, sich mit den fremden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu entwickeln. *Bact. coli mutabile* dagegen zeigt das Gärungsvermögen für Laktose um so besser, je weniger Keime vorhanden sind, und bei hinreichender Verdünnung in allen Individuen.

Darum würde man bei *Bac. solanacearum* noch eher an eine mutierende Art denken, als beim *Bact. coli mutabile*. Ein Argument für eine Antwort auf die Frage Mutante oder extreme Variante liegt jedoch nicht darin.

Zusammenfassung.

1. *Bacillus solanacearum* zeigt mit einer großen Anzahl verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen nur in einem Teile der angefertigten Kulturen Entwicklung.

2. Licht- und Temperaturunterschiede haben keinen, kleine Alkalitätsunterschiede geringen Einfluß auf diese Variabilität.

3. Je mehr Impfmateriel verwendet wird, um so mehr Kulturen gelingen. Nur eine sehr geringe Anzahl von Individuen, ein einziges unter vielen Tausenden, ist imstande, sich den neuen Nährböden anzupassen.

4. Die Form der Variabilität ist die Modifikation, weil die erworbenen Eigenschaften nicht konstant sind, wenn aufs neue in Tabak geimpft wird und der *Bacillus*, wieder aus diesem isoliert, in gleiche Lösungen übertragen wird.

5. Auch *Bacterium deliense* n. sp. zeigte einige Male dieselbe Variabilität.

Medan-Sumatra,
Biologische Abteilung der Deli-Proefstation.

Nachdruck verboten.

Keimungsversuche mit Konidien von *Phytophthora infestans* de Bary.

[Aus der botanischen Abteilung der entomologischen Versuchsstation der russischen Zuckerfabrikanten in Smela, Gouv. Kiew.]

Von Dr. L. Garbowski.

Mit 1 Tafel.

Über künstliche Kulturen von *Phytophthora infestans* liegen verhältnismäßig wenige Angaben vor.

Matruchot und Molliard (1) waren die ersten, denen solche Kulturen auf verschiedenen organisierten Substraten, wie spanische Melone, Kürbis usw. in größerem Umfange gelungen sind. Es wurden auch andere Nährböden, meist organischen Ursprungs, wie z. B. sterilisierte Scheiben obiger Früchte, Kürbisdekotgelatine u. a. erprobt, wie es aber scheint, mit weniger Erfolg, denn „bei saprophytischer Lebensweise bildeten sich die Sporen spärlich oder blieben ganz aus“. Angaben über künstliche *Phytophthora*-Kulturen finden wir auch bei Brefeld (2). Auch in dem XIV. Bande seines Werkes „Die Kultur der Pilze“ (3) stellt Brefeld fest, daß „die Konidien direkt oder auch die Zoosporen aus diesen in Nährlösungen, aus jungen Kartoffeln hergestellt und mit etwas Bierwürze versehen, leicht kultiviert werden können“. In seinen „Untersuchungen über *Phytophthora infestans*“ berichtet Hecke (4), daß er gute Kulturmedien für diesen Pilz in Abkochungen von Pflaumen, Paradiesäpfeln, Kirschen, Kartoffellaub usw. fand. Hecke hat unter anderem einen Gegensatz zwischen jungen und älteren Konidien festgestellt. Die jugendlichen Konidien sollen nicht befähigt sein, direkt, d. h. mit einem Keimschlauch, zu keimen, indem sie unter allen Umständen Schwärmer bilden, ältere dagegen verhalten sich entgegengesetzt; sie bilden niemals Schwärmer, sondern können direkt keimen. Umfangreiche Versuche „Über die Einwirkung von Metallsalzen und Säuren auf die Keimfähigkeit der Sporen von *Phytophthora infestans*“ stammen von E. Wüthrich (5) her. Er bemerkt, daß „die Konidien der *Phytophthora infestans* eine wechselnde, offenbar mit den Witterungsverhältnissen im Zusammenhang stehende Keimfähigkeit zeigen. Zeitweise erfolgt die Schwärmsporenbildung fast ausnahmslos bei allen Konidien, zu anderen Zeiten jedoch nur spärlich“. In destilliertem Wasser wurde regelmäßig Zoosporenbildung beobachtet. Der hemmende Einfluß der Lösungen von Metallsalzen und Säuren erstreckte sich zuerst auf die Schwärmerbildung, indem diese Keimungsart mit zunehmender Konzentration der genannten Agentien zurücktrat, der anderen, sog. direkten Auskeimung der Konidien mit Hilfe eines Keimschlauches Platz machend. Wüthrich bestätigt die schon früher (Hallier, Brefeld) gemachte Beobachtung, daß „Nährlösungen auf die Keimung der Konidien von *Phytophthora infestans* einen fördernden Einfluß ausüben“. In einer Malzextraktlösung wurde die Zoosporenbildung vollständig unterdrückt, und es trat nur „nahezu ausnahmslos“ direkte Auskeimung ein. In der letzten Zeit ist es besonders G. P. Clinton (6, 7) in Amerika, welcher die künstliche Kultur von *Phytophthora infestans* erfolgreich betreibt. Nachdem er vor einigen Jahren auf Maismehl gute Konidienfruktifikation erhalten hatte, berichtet er neuerdings über die neuentdeckte Zoosporenbildung dieses Pilzes auf einem aus Haferextrakt bereiteten Nähragar. Schließlich wären noch die Untersuchungen von Al. Kossowicz (8) über einige chemische Leistungen der Reinkulturen von *Phytophthora infestans* zu erwähnen.

1. Keimung der Konidien von *Phytophthora infestans* auf Nährböden organischen Ursprungs.

Das benutzte Sporenmaterial stammte von einer in der Nähe des Laboratoriums befindlichen Kartoffelparzelle, auf welcher am 20. Juli d. J. die Krankheit in Form von vereinzelt Flecken auf dem Laube konstatiert wurde. Leider griff die Pest wegen des regnerischen Wetters so rasch um sich (es regnete am 21., 22. und während der ganzen folgenden Nacht fast unaufhörlich), daß schon am 23. einzelne Stauden mit vollständig verrottetem

Laub niedergestreckt waren und in dem anfänglich dichten Stand sich kahle Stellen zeigten. Nach etwa 2 Wochen war es nicht mehr leicht, ein unbeschädigtes Blatt zu finden, und noch eine Woche später war überhaupt keine Spur mehr von dem Laube zu sehen. Einige weniger befallene Blätter, die am Abend in die feuchte Kammer gelegt wurden, lieferten am folgenden Tage eben ausgereiftes üppiges Aussaatmaterial. Es muß gleich an dieser Stelle bemerkt werden, daß selbst beim vorsichtigsten Entnehmen der Sporen mit Hilfe einer ausgeglühten Platinnadel, welche unter Zuhilfenahme einer Lupe ganz vorsichtig am weißen Räschen geführt wurde, ohne die Blattoberfläche zu berühren, es nicht möglich war, ganz reine Aussaaten des Pilzes in den Tropfenkulturen auf Objektträgern zu erhalten. Es scheinen gewisse fremde Organismen an den Sporen selbst, wie auch an den Konidienträgern zu haften, so daß sie regelmäßig mit in das neue Nährmedium der Konidien gelangen. Von diesen war besonders eine Hefeart lästig. Sie kam aber meist erst später zur Entwicklung, nachdem die *Phytophthora* konidien bereits ausgekeimt, resp. fruktifiziert hatten, so daß sie das Verhalten der letzteren gar nicht, oder nur ganz wenig maskieren konnte. Wurde aber beim Entnehmen der Sporen unvorsichtigerweise auch die Blattoberfläche berührt, so konnte unter Umständen das Aussaatmaterial so verunreinigt werden, daß fremde Organismen (hauptsächlich Bakterien) den Pilz vollständig überwucherten und die ausgesäten Konidien nicht einmal zur Keimung gelangen konnten. In solchen Fällen erschien regelmäßig auch *Cladosporium*-, zuweilen auch *Alternaria*-Vegetation. Wie gesagt, schließt ein vorsichtiges Vorgehen alle diese Organismen meist aus, und erlaubt demgemäß Beobachtungen über das Verhalten der Konidien von *Phytophthora* anzustellen.

Es wurden wässrige Auszüge aus den Blättern von *Solanum tuberosum*, *S. Lycopersicum*, *S. nigrum*, *Datura Stramonium* und *Hyoscyamus niger* hergestellt: 100 g frischer Blätter wurden fein zerschnitten, mit 100 ccm Brunnenwasser begossen, nach einer halben Stunde ausgepreßt, aufgekocht, filtriert und im Autoklaven sterilisiert. Kartoffelblattaufguß, welcher ebenso wie der obige bereitet, nur mit dem Unterschiede, daß die 100 g Blätter zuerst rasch in der Sonnenhitze getrocknet waren und erst dann wie oben behandelt wurden. Aufguß von jungen Kartoffelknollen, Haferaufguß, Gartenerdeaufguß — diese wurden im Verhältnis von 100 g jeder Substanz in frischem Zustande zu 200 ccm Brunnenwasser hergestellt und erst am folgenden Tage der Filtrierung und Sterilisation unterworfen; von derselben Gartenerde wurde noch ein anderer Aufguß nicht in reinem Wasser, sondern in einer 0,01 norm. Sodalösung hergestellt; am folgenden Tage wurde nach dem Abfiltrieren die Flüssigkeit, welche kaum gefärbt war, mit Zitronensäure neutralisiert und sterilisiert.

Versuch 1.

Es wurden Kulturen in Tropfen auf Objektträgern angelegt und in der feuchten Kammer unter einer Glasglocke während der Nacht gehalten.

Temperatur 21—22° C.

Beobachtung nach 15 Stunden.

Brunnenwasser sterilisiert. Einige Sporen haben Keimschläuche entwickelt; diese sind meist kurz, wenig verzweigt, wenn länger, etwas gedreht (Fig. 1).

Aufguß von frischen Kartoffelblättern. — Ein mit bloßem Auge sichtbarer Mycelflaum. Die Mehrzahl der Sporen hat reich verzweigte Mycelschläuche entwickelt; die

Sporen haben meist mit mehreren Keimschläuchen gekeimt mit Bevorzugung der Stelle neben dem Terminalknöpfchen als Austrittspunkt (Fig. 2).

Die Kulturen in Aufgüssen von *Solanum nigrum*, *S. Lycopersicum*, *Hyoscyamus niger* und *Datura Stramonium* unterschieden sich nicht wesentlich von der Kultur im Kartoffelblattaufguß. Es hat sich überall ein mit bloßem Auge sichtbarer Mycelflaum entwickelt. Auch das mikroskopische Bild bot keinen wesentlichen Unterschied gegenüber dem beschriebenen.

Bei Revision der Kulturen nach weiteren 8 Stunden konnte keine weitere Entwicklung wahrgenommen werden. Vielmehr schienen hier und da Bakterien die Oberhand zu gewinnen.

Versuch 2.

In denselben Nährböden wurden um 11 Uhr vorm. 2 Parallelversuche angestellt, und zwar unter einer verdunkelten Glasglocke und im Lichte, wobei, um die Fremdinfection möglichst auszuschließen, die größte Sorgfalt beim Entnehmen der Sporen von der Blattoberfläche angewandt wurde.

Temperatur 21° C.

Beobachtung nach 5 Stunden.

a) Kulturen im Dunkeln.

Wasser ster. — Keimung nicht eingetreten.

Frische Kartoffelblätter. Die Sporen haben mit mehreren Keimschläuchen gekeimt. Keimung fast allgemein (Fig. 3).

Solanum Lycopersicum: Die Sporen fangen eben zu keimen an (Fig. 4).

Hyoscyamus niger: Die Keimung setzt eben an, wie bei *Solanum Lycopersicum*; es finden sich aber weniger gekeimte Sporen.

Datura Stramonium
Solanum nigrum } nicht gekeimt.

b) Kulturen im Licht.

Wasser ster.: Nicht gekeimt.

Kartoffelblätter: Das Bild ähnlich demjenigen der verdunkelten Kultur, aber die Keimung ist nicht so allgemein wie dort.

Solanum Lycopersicum: Nur vereinzelte Sporen fangen zu keimen an.

Hyoscyamus niger
Datura Stram.
Solanum nigrum } Keimung nicht eingetreten.

Beobachtung nach weiteren 19 Stunden (24 Stunden seit dem Anlegen der Kultur).

a) Kulturen im Dunkeln.

Wasser ster.: Nicht gekeimt.

Kartoffelblätter: Mehrere Mycelschläuche sind vom Kulturtropfen in die Luft gewachsen und haben Konidien angelegt (Fig. 5).

Solanum Lycopersicum: Einzelne Mycelfäden haben fruktifiziert; sie tragen je eine Konidie.

Hyoscyamus niger: Die Sporen weisen mehrmals verzweigte, kurze, dicke Keimschläuche auf (Fig. 6).

Datura Stram.
Solanum nigrum } Die Zahl der ausgekeimten Sporen ist klein; das Entwicklungsbild ähnlich demjenigen von *Hyoscyamus niger*.

b) Kulturen im Licht.

Wasser ster.: Nur ganz vereinzelt haben die Sporen Keimschläuche gebildet. Diese sind dünn, inhaltsarm, nicht verzweigt.

Kartoffelblätter: Auf einzelnen Mycelschläuchen sind Konidien entstanden; Fruktifikation bei weitem nicht so üppig, wie in der verdunkelten Probe in derselben Nährflüssigkeit.

Solanum Lycopersicum: Ein paar Mycelfäden tragen je eine Konidie.

<i>Hyoscyamus niger</i> <i>Datura Stram.</i> <i>Solanum nigrum</i>	}	Die Zahl der ausgekeimten Sporen klein. Fruktifikation nirgends vorhanden.
--	---	--

Versuch 3.

In den Aufgüssen von frischen (I) und getrockneten (II) Kartoffelblättern, Hafer, Gartenerde (I) und Gartenerde (II), die mit 0,01 norm. Sodalösung ausgezogen und mit Zitronensäure neutralisiert wurden, sind Objektträgerkulturen angelegt worden. Zu einer anderen Reihe von Proben diente Nähragar, welcher von den genannten Aufgüssen so dargestellt wurde, daß jede der Flüssigkeiten mit einem gleichen Volum eines 2-proz. Agars vermischt wurde. Die 1-proz. Agarsubstrate enthielten somit dieselben Nährsubstanzen, wie die Aufgüsse, nur in halber Verdünnung. Temperatur 19—20° C.

a) Flüssige Kulturen:

2 Stunden nach der Aussaat wurde nirgends Keimung bemerkt. Nach 6 Stunden war die Entwicklung am kräftigsten in den Aufgüssen von frischen Kartoffelblättern, von Kartoffelknollen und von Hafer. Von den anderen Kulturen wies der mit Zitronensäure neutralisierte Gartenerdeaufguß II kein Wachstum auf und die zwei anderen Aufgüsse von Gartenerde I und von getrocknetem Kartoffellaub eine kümmerliche Auskeimung einiger Sporen. Die ersten 3 Kulturen, obwohl sie ziemlich stark mit Bakterien verunreinigt waren, sind trotzdem am 3. Tage zu einer spärlichen Fruktifikation gekommen. Von den anderen Kulturen wurde die in Gartenerdeaufguß I bis zum fünften Tage in der feuchten Kammer aufbewahrt, wobei sich in dieser Zeit ihr Sporenhalt meist in die inzwischen angelegten Sekundärkonidien ergossen hat (Fig. 7). Die alten Konidienhäute nebst Keimschlauch waren vollständig entleert.

b) Agarkulturen.

Beobachtung nach 3 Stunden.

Kartoffelbl. I	}	Keimung noch nicht eingetreten.
Hafer		

Beobachtung nach 6 Stunden (seit dem Anlegen der Kulturen):

Kartoffelbl. I	}	Überall die Sporen mit Keimschläuchen in großer Anzahl gekeimt.
Hafer		
Kartoffelknollen		

Gartenerde I: Wenige Sporen mit Keimschläuchen gekeimt.

Kartoffelbl. II	}	Keimung nicht eingetreten.
Gartenerde II		

Nach 24 Stunden (seit dem Anlegen der Kulturen):

Kartoffelbl. I	}	Es erheben sich vom Substrat mehrere Mycelfäden (Konidienträger) in die Luft. Fruktifikation noch nicht eingetreten.
Hafer		
Kartoffelknollen		

Gartenerde I: Einige Sporen haben gekeimt; Mycel schwach entwickelt; Konidienträger bemerkt man nicht.

Gartenerde II: Vereinzelte Sporen haben gekeimt.

Kartoffelbl. II: Eine einzige Spore mit Keimschlauch.

Nach 48 Stunden:

Kartoffelbl. I	}	An langen dünnen Konidienträgern meist je eine Konidie vorhanden; seltener die Konidien zu zweien an einem Träger.
Hafer		
Kartoffelknollen		

Gartenerde I	}	Entwicklung ist nicht weiter fortgeschritten.
Gartenerde II		
Kartoffelblätter II		

Es ist bemerkenswert, daß bei allen diesen Versuchen, und auch mehreren anderen, welche in denselben Substraten angelegt waren, niemals Schwärmer-

bildung beobachtet wurde. Es scheint unmöglich zu sein, daß bei den Aussaaten immer nur die „älteren“ Sporen in die Kultur gelangen sollten. Diese bestanden vielmehr aus Individuen verschiedenen Alters und verschiedenen Reifungsgrades. Besonders die „jüngeren“ Konidien waren ganz sicher da, denn es geschah bei der Aussaat öfters, daß ganze Konidienträger von ihrer Unterlage abgerissen wurden und mit den Sporen zusammen in den Nährtropfen gelangten. An ihnen hingen zuweilen noch nicht ausgereifte, kleine Konidien. Schwärmerbildung wurde auch bei diesen nicht beobachtet. Es wäre daher, wie es scheint, die Keimung mit Keimschlauch, als die normale Keimungsart der Konidien von *Phytophthora infestans* anzusehen, jedenfalls als eine viel öfter eintretende, als es in der Regel angenommen wird. Ob nicht etwa der Blatthalt in natürlichem Zustande irgendwie die Konidien zur Schwärmerbildung veranlaßt, suchte ich auf die Weise festzustellen, daß ich 1. Sporen in eben ausgepreßtem filtriertem Blattsaft keimen ließ, oder auch 2. im Wassertropfen, wo die Sporen keimen sollten, Stückchen von Kartoffelblättern legte und die Keimung beobachtete. Auch hier wurde regelmäßig nur Keimschlauchbildung konstatiert. Hecke (l. c.) spricht dem Licht jeden Einfluß auf die Konidienbildung von *Phytophthora infestans* ab. In meinem vergleichenden Versuch 2 ist allerdings eine hemmende Wirkung des Lichtes nicht nur auf die Zahl der auskeimenden Sporen, sondern auch auf die Konidienbildung zum Ausdruck gekommen.

Es ist erwähnenswert, daß die Konidien von *Phytophthora infestans* in der künstlichen Kultur sich deutlich besser in Auszügen gerade derjenigen Solanaceen entwickeln, auf welchen dieser Pilz unter natürlichen Verhältnissen stark parasitiert. Außer den Kartoffeln ist er auf Tomaten (9) mehrmals konstatiert worden. Sein Übergang auf die übrigen oben erwähnten Solanaceen ist, wie es scheint, bis jetzt nicht beobachtet worden. Rostrup (10) hat auf die Möglichkeit hingewiesen, daß *Phytophthora infestans* andere unserer einheimischen Solanaceen befallen könnte. Davon, daß sie auf *Hyoscyamus niger* gedeihen kann, habe ich mich in der Weise überzeugt, daß ich sie auf einem gesunden *Hyoscyamus*-Blatt in einer Petri-Schale sich gut entwickeln sah. Ich habe auf die Unterseite der Blätter von *Hyoscyamus niger*, *Datura Stramonium* und *Solanum nigrum* kleine Stückchen von Kartoffelblättern mit *Phytophthora*-Fruchtifikation ausgelegt und sie in Petrischalen feucht gehalten (Temperatur 22—24° C). Während die Blätter anderer Pflanzen intakt geblieben waren, zeigte sich am *Hyoscyamus*-Blatt der charakteristische braune Fleck, dessen Umfang rasch zunahm. Am 3. Tage ist an der Blattunterseite die Konidienfruchtifikation zustande gekommen.¹⁾

2. Keimung der Konidien von *Phytophthora infestans* in Lösungen von bestimmter chemischer Zusammensetzung.

Versuch 4.

Es wurden Objektträgerkulturen in destilliertem Wasser, sterilisiertem Brunnenwasser, frischem Brunnenwasser und in sterilisiertem Gartenerde-aufguß angelegt.

¹⁾ Infektionsversuche an Topfkulturen von *Solanum Lycopersicum*, *S. nigrum*, *Datura Stramonium* und *Hyoscyamus niger* waren ohne Erfolg.

Temperatur 21° C.

Beobachtung nach 14 Stunden:

Dest. Wasser: Eine Konidie mit Keimschlauch gekeimt.

Steril. Brunnenwasser: Sporen nicht gekeimt.

Frisches Brunnenwasser: Mehrere Sporen mit Keimschläuchen gekeimt.

Ster. Gartenerdeaufguß: Wenige Sporen mit Keimschläuchen gekeimt.

Dieser Versuch war der letzte, welcher mit *Phytophthora* sporen derselben Provenienz, wie die der obenbeschriebenen Versuche angelegt werden konnte. Wegen Mangels an Material wurden die Versuche unterbrochen und erst gegen Ende September, nachdem in Töpfen verpflanzte Knollen neues Kartoffellaub entwickelt hatten, wieder aufgenommen. Glücklicherweise zeigte sich auch auf den neuen Pflanzen die *Phytophthora*-fäule.

Versuch 5.

Es sind folgende Substanzen in Lösungen als Nährsubstrate für die *Phytophthora*-Konidien zur Anwendung gekommen: Glukose, Laktose, Saccharose, Glyzerin, Zitronensäure, Weinsäure, Asparagin, Pepton und die Lösung von Knop (11). Alle Lösungen waren 0,1 Proz. stark. Nur die Knop'sche Lösung war sterilisiert, alle anderen im frischen Brunnenwasser dargestellt und kurz nach der Darstellung zu den Kulturen benutzt. Temperatur 19—21° C.

Bei der Beobachtung nach 4 Stunden konnte nur festgestellt werden, daß in Oxalsäurelösung die Sporen getötet waren; ihr Inhalt war braun gefärbt und verlor zum Teil die gewöhnliche Alveolarstruktur. In den übrigen Lösungen hat sich an den Konidien nichts geändert.

Nach 20 Stunden.

Glukose } Entwicklung sehr kräftig. Das Bild ähnlich demjenigen im Kartoffel-
Knop. } blattaufguß (Versuch 1). Die Mehrzahl der Sporen hat mehrere Keimschläuche entwickelt, welche zu kräftigen Mycelfäden ausgewachsen sind. Einige von ihnen haben schon angefangen, sich in die Höhe zu strecken.

Laktose } Entwicklung mäßig gut, ungefähr gleich, allerdings weit hinter der
Saccharose } in Glukoselösung.

Glyzerin } Einige Konidien sind zur Keimung gekommen.
Weinsäure }

Zitronensäure: Zwei Konidien gekeimt.

Asparagin } Einige Konidien haben Keimschläuche gebildet; diese sind stellen-
Pepton } weise zu langen Fäden ausgewachsen. Die *Phytophthora*-Entwicklung war hier offenbar durch fremde Organismen (Asparaginkultur durch Hefen und *Alternaria*, Peptonkultur durch Bakterien) stark gehemmt.

Nach 48 Stunden:

Glukose: Sehr üppiges vegetatives Wachstum; Fruktifikation noch nicht eingetreten.

Knop'sche Lösung: Großes Mycel; einige neue Konidien entstanden.

Laktose } Die Entwicklung viel schwächer als in obigen Lösungen, einige
Saccharose } Konidien entstanden.

Glyzerin }
Weinsäure } Entwicklung sehr kümmerlich.
Zitronensäure }

Asparagin } Kulturen stark verunreinigt, ausgeschaltet.
Pepton }

Nach 72 Stunden ist Fruktifikation in allen Lösungen eingetreten.

Versuch 6.

Dieselben Lösungen (außer Glyzerin und Oxalsäure), wie im Versuch 5, sind frisch dargestellt und sterilisiert worden. Außer diesen kam noch eine kombinierte Lösung zur Anwendung, welche aus einer Mischung gleicher

Volumina der Knopschen Lösung und einer 0,2-proz. Glukoselösung bestand und ein Nähragar, bestehend aus 50 ccm einer mit 0,2 g Glukose versetzten Knopschen Lösung, welche mit 50 ccm einer 2-proz. wässrigen Agarlösung vermischt wurde.

Temperatur 19—21° C.

Beobachtung nach 3 Stunden:

Asparaginlösung: Fast alle Konidien haben Schwärmer gebildet. Außer vielen herumschwimmenden Schwärmern sieht man am Boden die entleerten Konidienhäutchen (Fig. 8).

Laktose } Einzelne Konidien haben Schwärmer gebildet; die große Mehr-
Saccharose } zahl ist unverändert geblieben.

In allen übrigen Lösungen und ebenso im Nähragar ist keine Veränderung eingetreten.

Nach 15 Stunden (die Temperatur ist in der Nacht bis 12° C gefallen):

Glukose	} Die Sporen haben nicht gekeimt.
Knop	
Knop - Glukose	
Knop - Glukose-Agar	
Zitronensäure	
Weinsäure	

Asparagin: Sämtliche Schwärmer haben Keimschläuche entwickelt. Diese sind immer eigentümlich gekrümmt, zuerst dicker, später dünn und gedreht (Fig. 9).

Saccharose } Die Zahl der entleerten Konidien hat wenig zugenommen. Die Ent-
Laktose } wicklung der Schwärmer wie in Asparaginlösung.

Pepton: Viele Konidien haben gekeimt; einige von ihnen haben Schwärmer gebildet, die sich weiter, wie in Asparaginlösung, entwickeln, an den anderen sind Keimschläuche entstanden.

Nach 20 Stunden:

Das Wachstum schreitet nicht weiter fort.

Auch nach 48 Stunden sind die Kulturen nicht zur weiteren Entwicklung gekommen. Nur in der Knopschen Lösung entstanden an einigen Sporen Sekundärkonidien. Die Keimschläuche der Schwärmer in Asparaginlösung sind nicht weiter gewachsen, vielmehr konnte man an ihnen Desorganisationserscheinungen wahrnehmen, bestehend in Krümmungen und fortschreitendem Dünnerwerden.

Dieser letzte Versuch wurde am 29. September angestellt.

Überblickt man die beobachteten Erscheinungen in der zweiten Versuchsreihe, so ist zuerst das Verhalten der *Phytophthora* konidien in Wasser beachtenswert. Die ergiebige Keimung im gewöhnlichen Brunnenwasser gegenüber der spärlichen Entwicklung im sterilisierten oder destillierten Wasser ist wahrscheinlich auf den Sauerstoffgehalt des ersten zurückzuführen.

Der fördernde Einfluß von Nährlösungen auf die Keimung der Konidien von *Phytophthora infestans* ist, wie gesagt, schon mehrmals betont worden. Man sieht, daß dieser Pilz selbst in der Knopschen Lösung zur Fruktifikation gelangen kann. Ein Glukosezusatz zu dieser Lösung erhöht ganz erheblich ihre Nährkraft und es entsteht auf diese Weise ein vorzügliches Nährmedium für *Phytophthora infestans*. Dies konnte aus der Entwicklung gelegentlich angestellter anderer Kulturen in diesem Nährsubstrat gefolgert werden. Es entstehen zuweilen in solchen Kulturen außer den gewöhnlichen Konidien noch monströse, aufgeblähte Gebilde, welche die gewöhnlichen Konidien in der Größe einige Male übertreffen. Diese Blasen bilden sich entweder an Stelle der Konidien, also an den Enden der aus dem Flüssigkeitstropfen hervorragenden Hyphen, oder auch im Verlaufe der Hyphen im Nährmedium selbst (Fig. 10). Betrachtet

man diese Blasen unter dem Mikroskop, so sieht man sie nach kurzer Zeit zusammenschrumpfen. Es sind offenbar hauptsächlich mit Wasser gefüllte Auftreibungen, welche vielleicht mit einer gewissen Überernährung des Pilzorganismus zusammenhängen. Aus der dampfgesättigten Atmosphäre der feuchten Kammer in die Luft gebracht, verlieren sie den Hauptteil ihres Inhaltes durch Verdunstung und ziehen sich infolgedessen zusammen. Auch in den Haferaufgußkulturen (s. Versuch 3) habe ich diese Erscheinung beobachtet.

In dieser zweiten Versuchsreihe ist gleichfalls die Keimschlauchbildung als die dominierende Keimungsart für *Phytophthora*-Konidien zum Ausdruck gekommen. Es konnte leider nicht mehr das eigentümliche Verhalten der Konidien in Asparaginlösung, sowie der scheinbare Gegensatz zwischen Glukoselösung einerseits und Saccharose- und Laktoselösung andererseits — die allgemeine Keimung mit Keimschläuchen in der ersten Lösung und eine teilweise Schwärmsporenbildung in beiden anderen Zuckerlösungen — näher ermittelt werden. Ebenso bleibt das Verhalten in Peptonlösung, wo zum Teil Keimschläuche, zum Teil Schwärmer gebildet waren, einstweilen unaufgeklärt. Die Membran der Konidien beim Austritt der Zoosporen platzt (12) nicht, sondern diese schlüpfen durch eine Öffnung, welche an ihrem Scheitel durch Auflösung des Terminalknöpfchens entsteht, aus.

Der Zweck der beschriebenen Versuche war, eine Nährlösung von bestimmter chemischer Zusammensetzung für *Phytophthora infestans* zu finden, um diesen bis jetzt so wenig bekannten Pilz in Reinkultur näher studieren zu können. Es scheint, daß man zu diesem Zwecke von der Knop-Glukose-Lösung ausgehen könnte.

Literatur.

1. Matruchot, L., et Molliard, M., Sur le *Phytophthora infestans*. (Annales mycolog. Vol. 1. 1903. p. 540—543; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 239.)
2. Brefeld, O., Botan. Unters. über Hefepilze. H. 5. Leipzig 1883. p. 10.
3. Brefeld, O., Untersuchungen a. d. Gesamtgeb. d. Mykologie. Bd. 14. Die Kultur der Pilze. Münster 1908. p. 116.
4. Hecke, L., Untersuchungen über *Phytophthora infestans* de By. als Ursache der Kartoffelkrankheit. (Journ. f. Landw. 1898. p. 71—97; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. p. 650; und in Jahresber. f. Pflanzenschutz v. Hollrung: 1898. Bd. 1. p. 42.)
5. Wüthrich, E., Über die Einwirkung von Metallsalzen und Säuren auf die Keimfähigkeit der Sporen einiger der verbreitetsten parasit. Pilze unserer Kulturpflanzen. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 2. 1892. p. 16.)
6. Clinton, G. P., Downy Mildew or Blight *Phyt. inf. de By of potatoes*. (Rep. Connect. Agric. Exp. Stat. f. 1905; Ref. Jahresber. f. Pflanzenkrankh. v. Hollrung. Bd. 9. 1906.)
7. Clinton, G. P., Oospores of potato-plight. (Rep. Connect. Exp. Stat. for 1909—1910; Ref. Acta horti botan. Univers. Jurjewensis. Vol. 12. 1911. p. 241.)
8. Kossowicz, A., Die Zersetzung von Harnstoff, Harnsäure, Hippursäure und Glykokoll durch Schimmelpilze. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 1. 1912. p. 60; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 248.)
9. Marchal, E., Die im Jahre 1902 in Belgien beobachteten Pilzkrankheiten. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 13. 1903. p. 217.)
10. Klebahn, Übersicht über die im Jahre 1891 von Rostrup beob. Pilzkr. der Kulturpfl. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 3. 1893. p. 147.)
11. Küster, E., Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. Leipzig 1907. p. 17.
12. Sorauer, P., Handb. der Pflanzenkrankheiten. Berlin 1908. Bd. 2. p. 133.

Tafelerklärung.

(Alle Figuren sind bei 260facher Vergrößerung unter Benutzung des Zeichenapparates gezeichnet.)

Fig. 1. Keimung der *Phytophthora*-Konidien in steril. Brunnenwasser nach 15 Stunden bei 21—22° C.

Fig. 2. Keimung im Aufguß von frischen Kartoffelblättern nach 15 Stunden bei 21—22° C.

Fig. 3. Keimung im Aufguß von frischen Kartoffelblättern nach 3 Stunden. Temp. 21° C.

Fig. 4. Keimung im Aufguß von Tomatenblättern nach 3 Stunden. Temp. 21° C.

Fig. 5. Fruktifikation im Aufguß von frischen Kartoffelblättern nach 24 Stunden. Temp. 21° C.

Fig. 6. Entwicklung im Aufguß von *Hyoscaamus niger*-Blättern nach 24 Stunden. Temp. 21° C.

Fig. 7. Bildung von Sekundärkonidien in Gartenerdeauszug nach 5 Tagen.

Fig. 8. Sporenhäute nach dem Austritt der Zoosporen in Asparaginlösung nach 3 Stunden. Temp. 19—21° C.

Fig. 9. Keimung der Zoosporen in Asparaginlösung nach 15 Stunden. Temp. 19—21° C.

Fig. 10. Blasenbildung in *Knop*-Glukose-Lösung. a, b, c — Eine im Verlauf der Hyphe angelegte zusammenschrumpfende Blase.

Nachdruck verboten.

Mistel-Infektionen zur Klärung der Rassenfrage.

Von C. von Tubeuf.

Seit 1886 laufen meine Untersuchungen über Loranthaceen und hauptsächlich über *Viscum album* neben anderen Arbeiten weiter¹⁾. Die besonders während meiner Assistentenzeit am Karlsruher Polytechnikum (Frühjahr und Sommer 1887) in Angriff genommene Rassenfrage mit den interessanten Erhebungen in Baden und bei Straßburg wurden in den Folgejahren auch in Bayern ausgedehnt und führten zunächst zu einer Publikation im November 1889 im bot. Verein München (im Auszug veröffentlicht im November 1889 in den Münchener Neuesten Nachr. und ausführlicher im Botan. Centralbl. anfangs 1890). Einen weiteren Kreis suchte ich dann für diese Fragen durch einen Artikel in den Münchener Neuesten Nachrichten (Jan. 1891), die damals wissenschaftliche Übersichten brachte, und durch Ausführungen über die Analogie der Mistelrassen mit den sog. biologischen Rassen der Uredineen S. 343 in meinem Buche über Pflanzenkrankheiten (Verl. Springer. Berlin 1895) zu interessieren. Erst nach meiner Berliner Zeit und der Rückkehr nach München (1902) begann ich trotz beschränkter Raumverhältnisse mit Infektionsversuchen. Der Mangel eines Gartens oder Versuchsfeldes außerhalb der rauchgeschwängerten und daher den Coniferen tödlichen Stadtluft brachte die größten Schwierigkeiten und hat vielen Versuchspflanzen und Versuchen immer wieder ein Ende bereitet. Ja es hat sich gezeigt, daß es unmöglich ist, z.B. Fichten im Freien mit Überwinterung im Keller oder bei Kultur im Glashause längere Zeit gesund zu erhalten. Die Infektionen ergaben aber Resultate, welche es nötig erscheinen ließen, größere, planmäßige Versuchsserien anzulegen. Ich hätte gerne solche Versuche wieder jahrelang fortgeführt, um dann erst mit ihrer Publikation

¹⁾ Beiträge zur Kenntnis der Baumkrankheiten. Berlin (Springer) 1888.

hervorzutreten, allein die Veröffentlichung Heckes über diesen Gegenstand (Naturwissenschaftl. Zeitschr. f. Land- u. Forstwirtschaft. 1907. p. 210) veranlaßte mich zu einer früheren Publikation, die mit einer denselben Gegenstand betreffenden Veröffentlichung Heinrichers¹⁾ zeitlich zusammentraf: „Die Varietäten oder Rassen der Mistel“ (Naturwissenschaftl. Zeitschr. f. Land- u. Forstwirtschaft. 1907. p. 321).

Das Resultat Heckes mit dem negativen Infektionserfolg von Apfelbaummistel auf Weißtanne hielt ich, obwohl es meine frühere Annahme bestätigt, nicht für beweisend (l. c. p. 337), da — wie ich schon so oft hervorhob — negative Resultate erst dann als beweisend betrachtet werden können, wenn sie sehr zahlreich und öfter wiederholt sind. Auch ich hatte damals schon Mißerfolge von Infektionen der Laubholzmistel auf Weißtanne zu verzeichnen, aber auch Mißerfolge von Laubholzmisteln auf Laubhölzern usw. Die Heckeschen Versuche haben ihren Wert erst als Einfügungen in die Serien von Heinricher und mir erhalten und auch dadurch, daß auch sie die Notwendigkeit ausgedehnterer Versuchsserien bewiesen. Leider scheint auch Hecke unter dem Mangel eines geeigneten Versuchsgartens in gegen Wind und Sonne geschützter Lage wenigstens beim Experimentieren mit Nadelhölzern zu leiden. Seitdem haben Heinricher und ich — jeder für sich — an dem Problem weitergearbeitet, und ich hätte auch jetzt wieder eine Publikation gerne noch hinausgeschoben, wenn nicht Heinricher neue Resultate schon veröffentlicht (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. Nov. 1911), dadurch eine weitere Aussprache beschleunigt und neue Veröffentlichungen in Aussicht gestellt hätte.

Der verehrte Kollege Heinricher hat in objektiver und lebenswürdiger Weise meine, in seine Besprechung eingeflochtenen Resultate überall aufs anerkennendste behandelt und zitiert und meine Priorität in der Rassenfrage der Mistel voll anerkannt.

Er beansprucht für sich nur die entschiedene Betonung der Rassenbildung innerhalb der Laubholzmistel, d. h. die Angewöhnung der Laubholzmistel an einzelne Laubholzarten, so daß man etwa von einer angewöhnten Apfelbaummistel, Lindemistel, Eichenmistel usw. reden könnte.

Dabei spricht er seine Verwunderung aus, daß ich dieser Auffassung zwar an mehreren Stellen meiner Arbeiten zuneige und beipflichte, aber an anderen Stellen wieder einen mehr skeptischen Standpunkt einnehme.

Diese Skepsis, die ich zugeben muß, erklärt sich darin, daß mir auch hier wieder das Grundlagenmaterial zu einer ganz bestimmten und sicheren Auffassung noch nicht ausreichend erschien und neue Resultate nur nach langjähriger Arbeit gewonnen werden, denn Infektionsversuche mit *Viscum* sind in der Regel erst nach 3—4 Jahren zu beurteilen. Die Versuchspflanzen müssen jahrelang bei Gesundheit und guter Pflege erhalten und mancher Versuch muß erneuert werden. Ich begrüße es daher lebhaft, daß auch Heinricher seine Versuche fortführt und weiterpflegt, zumal er ja in seinem neuen botanischen Garten oberhalb Innsbruck weit günstigere Verhältnisse hat als sie mir geboten sind oder bisher geboten waren.

Wohlgefestigt sind nach meinen früheren Versuchen und Beobachtungen drei Mistelrassen, nämlich die Kiefernmistel, die Tan-

¹⁾ Beiträge zur Kenntnis der Mistel. (Zeitschr. f. Land- u. Forstw. 1907. p. 357.)

nen mistel und die Laubholzmistel. Die beiden ersteren hauptsächlich dadurch, daß sie sich in getrennten Gebieten entwickelt und erhalten haben und da, wo sie in der gleichen Gegend vorkommen, meist doch noch durch den Standort räumlich getrennt und wohl auch durch verschiedene Blütezeit vor Vermischung geschützt sind, zumal ihre Bestäuber nicht allzu weite Flüge machen. Immerhin besteht die Möglichkeit der Vermischung und somit der Verwischung der Rassen in Gegenden, wo beide oder alle 3 Rassen vorkommen.

Daß die Vermischung der Rassen möglich ist, geht aus einem Versuche hervor, den ich zur Klärung dieser Frage mit 2 verschiedenen Mistelarten anstellte. Ich bestäubte im Gewächshause die auf Silberweide gezogene weibliche Apfelbaummistel mit den Pollen der rotfrüchtigen Mistel, *Viscum cruciatum* aus Spanien. Die Bestäubung hatte den Erfolg, daß von *Viscum album* eine weiße Beere gebildet wurde, welche in normaler Weise keimte. Leider drang der Keimling nicht auf die ihm gebotene, den beiden Misteleltern holde Nährpflanze, *Crataegus Oxyacantha* ein und ging somit wieder zugrunde. Immerhin war die Möglichkeit der Bastardierung zwischen den *Viscum*-Arten erwiesen und ist um so mehr zwischen den Rassen unserer Mistel anzunehmen. Die Ausbildung der Kiefern-, Tannen- und Laubholzrasse möchte ich auf eine weiter zurückliegende Zeit zurückführen, von der wir noch nicht viel wissen. Nach den norddeutschen Moorfunden gab es dort eine schmalblättrige Mistel neben Laubholzresten. Ob diese auf der Eiche lebte, ist nicht sicher. Man streitet auch noch darüber, ob die Eiche oder die Kiefer nach der Eiszeit zuerst einwanderte und man weiß nicht, ob die Mistel damals schon mitwanderte, ob sie von Laub- auf Nadelholz oder umgekehrt übergang und eine Rasse bildete oder ob diese Rassen schon bestanden und ob sich demnach die getrennten Rassen verbreiteten.

Es ist ja möglich, daß die Kiefernmistel erst viel später mit der Kiefer aus dem Südosten eingewandert oder ihr nachgefolgt ist. Sie ist am meisten für eine besondere Art oder Varietät angesehen worden, da sie immerhin morphologische Eigentümlichkeiten hat, die durch die individuellen Eigentümlichkeiten und das Substrat (also die Wirtspflanze) verdeckt werden. Als physiologische Rasse kennzeichnet sie sich durch das ausschließliche Gedeihen auf ganz bestimmten Holzarten, obwohl sie auch in andere eindringt, aber sich in ihnen nicht weiter entwickelt. Ob und wann sie sich von der Laubholzmistel abgetrennt und an die zweinadeligen Kiefern angewöhnt hat, ist also nicht zu sagen; zu beweisen ist nur, daß die jetzige Laubholzmistel nicht auf die Kiefer übergeht.

Bei der Laubholzmistel selbst fiel es von jeher auf, daß sie in verschiedenen Gegenden gewisse Holzarten in Menge besiedelt, in anderen Gegenden dieselben Holzarten aber meidet und ganz andere bevorzugt. Über die Gründe dieser Erscheinung war man nicht klar, doch sagte ich schon im Jahre 1888 l. c. p. 18: „Wie in Europa, so bewohnt dieser Parasit auch in Japan eine größere Reihe von Laub- und Nadelhölzern, zeigt aber auch hier wieder verschiedene Liebhabereien, indem er in Japan Holzarten bewohnt, welche er in Europa verschmäht.“ Nachdem ich im Laufe meiner Studien physiologische Rassen bei Tanne, Kiefer und Laubholz unterschieden hatte, lag es allerdings nahe, diese „Liebhabereien“ auch als Anpassung von Lokalrassen durch Angewöhnung an bestimmte Laubholzarten anzu-

nehmen, und ich bin diesem Gedanken bald näher getreten, bald wieder mehr von ihm abgerückt, wie Heinricher richtig hervorhebt. Heinricher dagegen vertritt ihn mit aller Bestimmtheit und größtem Nachdruck, und was er an Experimenten von Peyritsch, von sich, von mir und Hecke anführt, ist dieser Vorstellung nicht entgegen. Wenn ich trotzdem skeptisch geblieben bin, so sind es folgende Erwägungen: Das Auftreten der Mistel auf bestimmten Holzarten hängt von verschiedenen Ursachen ab.

1. Von der Verbreitungsweise durch Tiere, insbesondere durch bestimmte Vogelarten.

Ich habe daher zunächst Experimente angestellt, welche Tiere bei der Verbreitung in Betracht kommen¹⁾.

Heinricher stellt die Sache l. c. p. 285, 267 u. 271 so kurz dar, als ob ich die lokale Bevorzugung bestimmter Laubholzarten durch die Mistel nur auf Eigenart der Vögel zurückgeführt hätte, ich sagte aber p. 15 meiner Broschüre „Die Mistel“, Stuttgart (E. Ulmer) 1906: „In verschiedenen Gegenden findet man auch verschiedene Holzarten von der Mistel bevorzugt. Diese Auswahl hängt wohl in erster Linie mit der Verbreitung der Mistelfrüchte durch Vögel zusammen.“ Ich habe also diese Auswahl nur in erster Linie auf die Eigenart der Vögel zurückgeführt. Ich sagte mir, daß die Mistel in Hochlagen und rauhen Gegenden oder an Landstraßen oder an Wasserläufen und in gewissen Vogelzuggebieten vielleicht von verschiedenen Vogelarten oder doch von verschiedenen Drosselarten verbreitet wird. Und tatsächlich wird sie zwar am meisten von den Misteldrosseln beim Frühlingszug verbreitet, gelegentlich aber auch vom Seidenschwanz, der in großen Scharen kalte Winter bei uns herumstreichend zubringt. Und über andere Vogelarten liegen ausreichende Beobachtungen (durch Abschuß und Magenuntersuchungen) nicht vor.

Daß *Sorbus Aria* und *Aucuparia* bevorzugt sind, dürfte nicht bloß von ihrer hohen Empfänglichkeit, sondern auch daher kommen, daß die Drosseln diese Bäume ihrer Früchte wegen gerne aufsuchen. Es ist sehr möglich, daß die Drosseln auch sonst bestimmte Bäume bevorzugen. Ich machte deshalb z. B. Fütterungsversuche mit Amseln, weil mir die Vorstellung verführerisch erschien, daß die Zunahme der Mistel auf den Apfelbäumen der Dorfgärten mit dem sich mehrenden Hang der Amseln (bes. der alten), bei uns aus einem Zugvogel ein Standvogel zu werden und sich mitten in den früher gemiedenen Dörfern und Städten aufzuhalten, zusammenhänge. Aber meine Fütterungsversuche gaben keinen Anhalt, die Amsel für die Verbreitung der Mistel verantwortlich zu machen. Man muß aber doch damit rechnen, daß die Vögel lokal bestimmte Holzarten zum Aufbaumen bevorzugen, vor allem die Bäume an Straßen und Waldrändern. Es kommt auch für den Infektionserfolg darauf an, ob eine Holzart nur gelegentlich oder massenhaft und regelmäßig infiziert wird.

Diese Momente können durch vergleichende Infektionsversuche teils ausgeschaltet, teils reguliert werden.

2. Als zweites Moment kommt, was eben Heinricher als eigentlichen Grund der lokalen Bevorzugung einzelner Laubholzarten durch die

¹⁾ Über die Beziehungen zwischen unseren Misteln und der Tierwelt. (Naturw. Zeitschr. f. Land- u. Forstw. 1908. p. 47.)

Mistel ansieht: Die Möglichkeit, daß die Mistel sich lokal nur an bestimmte Laubholzarten angepaßt, „angewöhnt“ habe. Zu diesem Punkte möchte ich mich mit den beiden folgenden noch äußern.

3. Als weiteres Moment kommt in Betracht, daß die verschiedenen Holzarten selbst sich lokal verschieden verhalten können. Sie werden sich z. B. nicht gleich verhalten, je nachdem sie selbst sich in optimalen Verhältnissen befinden oder weit von denselben entfernt sind. Wie sehr das Gedeihen der Mistel von dem Gedeihen der Holzart abhängig ist, zeigten sehr viele meiner Beobachtungen und Versuche. Die Mistel wächst auf dicken Ästen und am Stamm üppiger, schneller und mit größeren Blättern wie an dünnen, schwachwüchsigen Zweigen und sie wächst z. B. besonders üppig auf einem abnorm gesteigerten Zuwachs, wenn man einen Stamm mit Schnur unterbindet, so daß die zuströmenden Baustoffe gestaut werden.

4. Es müssen oftmals individuelle Eigenschaften von Holzarten als Disposition angenommen werden. Wenn z. B. in ganz Deutschland nur eine deutsche Eiche von der Mistel bewohnt ist, dürfte individuelle Disposition der Wirtspflanze eine Rolle spielen, ebenso bei den seltenen Fällen des Befalles von Schwarzerle und Weißerle, auf die ich noch zurückkomme.

Wenn die Laubholzmistel Rassen ausbildet, muß dies leicht und zur Jetztzeit oftmals erfolgen, und es können die Rassen nicht sehr konstant bleiben, weil die Misteln auf den verschiedenen Laubhölzern in der Blütezeit immer zusammentreffen können und somit fortgesetzter Mischung unterliegen, während z. B. Laubholzmistel und Kiefernmisteln nicht ganz gleichzeitig zu blühen scheinen. Es könnten ja auch in Parks aus spezialisierten Misteln wieder solche entstehen, welche nicht an bestimmte Baumarten angewöhnt sind, während Heinricher annimmt, daß in Parks, welche vielerlei mistelbefallene Holzarten haben (z. B. Eisgrub, Sárvár, Kaltern usw.), mehrere an bestimmte Holzarten angepaßte Rassen nebeneinander wachsen. Nur an Lokalitäten, an denen seit langen Zeiten nur eine Holzart von der Mistel befallen ist, könnten sich meines Erachtens besondere Rassen auf einzelner Holzart entwickeln.

Eine solche Rasse könnte z. B. die Birkenmistel in den hiesigen Isarauen sein. 20 Jahre sah ich in den Isarauen Misteln nur auf einer kleinen Anzahl benachbart frei auf einer Wiese stehender Birken und auf *Craegus*, dessen Mistel sicher von der direkt über ihm wachsenden Birkenmistel abstammte. Die zahlreichen Schwarzpappeln und Silberweiden — die sonst sehr oft von *Viscum* büschen besetzt sind — blieben frei und ebenso die sehr zahlreichen anderen Laub- und Nadelholzarten. Heinricher führt diesen Fall für seine Ansicht an, und er schien ja auch darauf zu deuten, daß die Birkenrasse eine andere sein möge wie die Pappel- und Weidenrasse. Nun fand ich in diesem Frühjahr zum ersten Male einen Mistelbusch auf einer der Schwarzpappeln in der Nähe der Birkenmisteln. Mir scheint dies zu beweisen, daß die Birkenmistel die Fähigkeit, auf Pappel überzugehen, nicht verloren hat. Heinricher wird entgegen, daß sie aber ihre Virulenz der Pappel und Weide gegenüber vermindert habe. Dagegen läßt sich anführen, daß auch einige benachbarte Birkenbäume ganz frei geblieben sind. Dies würde wieder für besondere Disposition der befallenen Birkenbäume sprechen. Ob die Birkenmistel von dort, die seit Jahrzehnten eine reine Bestäubung mit den Pollen von Birkenmisteln erfahren hat und

Mistel. Inf. 16. Jan. 1909.		Tannenmistel. Inf. 13. Nov. 1908. Nachinf. 16. Jan. 1909, 7. Jan. 10, 23. Febr. 1910.	
e tot	—	alle Keimlinge tot	—
"	—	" " "	—
"	—	" " "	—
gestorben	—	" " "	—
e tot	—	" " "	—
erste große	—	" " "	—
n	—		
e tot	—	" " "	—
"	—	" " "	—
"	—	" " "	—
"	—	" " "	—
"	—	" " "	—
"	—	3 Keime mit 2 Blättchen	1912 5 Pflänz-
"	—	3 lebende, aufgerichtete K.	chen mit Bl.
"	—	alle Keimlinge tot	sehr schmalblättr.
auf einer An-	—	" " "	—
(1912)	—	" " "	—
e tot	—	" " "	—
"	—	" " "	—
Keimlinge	1912 ein K. noch	" " "	—
	lebend, aber ohn.		
	Blättchen, ein		
	Keimling tot		
e tot	—	" " "	—
"	—	" " "	—
"	—	2 lebende, aufgerichtete	1912 Tanne abge-

deren Nachkommen dort alle von den Birkenmisteln herstammten, sich experimentell auf andere Laubhölzer wird übertragen lassen, sollen im Gang befindliche Versuche später zeigen.

Ich fand aber auch an anderem Orte neben vielen von Misteln befallenen Pappeln eine einzelne misteltragende Birke.

Ich habe früher angegeben, daß die Mistel nur einmal in Deutschland und einmal in der Schweiz auf einheimischer Eiche gefunden wurde, daß es aber im nördlichen Frankreich einzelne von Mistelbüschen ganz übersäte Eichen gibt und daß die Mistel in England und Frankreich überhaupt öfters auf Eichen auftritt. Aus diesen Angaben folgert Heinricher, daß die Eichenmistel dort durch Gewöhnung sich zu einer Rasse gebildet hat und das Gleiche gelte für Galizien, Wolhynien, Podolien und die Ukraine, wo nach Blonski das Vorkommen der Eichenmistel tatsächlich festgestellt sei.

Wir wollen zunächst von den Angaben Blonskis absehen. Aus den anderen, genügend gesicherten Angaben kann man meines Erachtens auch den Schluß ziehen, daß es einzelne für den Mistelbefall disponierte Eichenindividuen gibt und daß solche in Frankreich und England öfters vorkommen. Bei den beiden Vorkommnissen in Deutschland und der Schweiz kann man ja von vornherein nicht von einer Eichenmistelrasse sprechen, da es sich um isolierte Einzelfälle handelt. Die von mir angegebenen französischen Vorkommnisse sprechen noch weniger für die Bildung von Eichenmistelrassen.

Es wird nämlich von französischen Forschern angegeben, daß die Mistel, welche einzelne alte Eichen in Massen besiedelt hat, auf die Eichen der Umgebung nicht übergegangen sei und daß sie auch nicht künstlich auf Eichen gezogen werden konnte, welche Nachkommen der alten mistelbesetzten Eiche waren. Demnach haben die französischen Forscher schon früher die Frage der Rassenbildung innerhalb der Laubholzmistel, d. h. die Angewöhnung an bestimmte Laubholzarten, hier die Eiche, ins Auge gefaßt, aber nicht zu beweisen vermocht (ebenso ist diese Frage schon von Zalewski und Blonski erörtert worden, 1891 und 1904, und es sind zur Lösung dieser Frage auch Aussaatversuche vorgeschlagen worden). Es bleibt also wohl eine individuelle Disposition der einzelnen Alteiche wahrscheinlich.

Ich habe Beeren der berühmtesten mistelbesetzten Alteiche aus dem nördlichen Frankreich kommen lassen und zu Infektionsversuchen verwendet.

Diese Infektionen ergaben nach 4 Sommern beblätterte Mistelpflanzen auf amerikanischer Esche (7 Stöcke) und eine beblätterte Pflanze auf *Sorbus Aucuparia*. Ferner unbeblätterte 3jährige Keimlinge auf *Quercus rubra*, *Betula verrucosa*, *Sorbus Aucuparia*, noch 4 Keimlinge auf Anschwellung der Nährpflanze, aber auf einer *Quercus pedunculata*-Pflanze nur 2, auf 2 *Quercus cerris* gar keine lebenden Keimlinge. Ebenso waren die Keimlinge im 3. Jahre auf allen anderen Nährpflanzen wieder abgestorben (siehe die Tabelle 8 „Vergleichende Infektionen in Freising“).

Während diese Versuche im Freien in Freising angestellt wurden, ergaben Parallelversuche im Glashause ein ähnliches Resultat: Weder auf *Quercus pedunculata* noch auf *Quercus rubra* kam es zu beblätterten Pflanzen.

Die Ergebnisse aller dieser Versuche und Beobachtungen ermöglichen nicht als Beweise für die Bildung einer Eichenmistelrasse herangezogen zu werden.

Wenn sich Heinricher aber auf Blonski stützt bezüglich des Vorkommens von Eichenmistel in Galizien, Wolhynien, Podolien und der Ukraine, so ist dem entgegenzuhalten, daß die Angaben in dem Referate (Bot. Centralbl. 1905, 2. p. 114) nicht belegt sind und daß es sich in der Originalarbeit nur um vereinzelte Funde nach Literaturangaben handelt und zwar zum Teil um Angaben aus alter Zeit. Wie unsicher solche Angaben sind, habe ich bei meinen Nachforschungen leider immer wieder erfahren müssen. Ohne Belege sind sie zum großen Teile unglaublich. Nach Blonski soll eine Verwechslung mit *Loranthus* ausgeschlossen sein, weil seine Verbreitung südlicher wie die genannten Standorte verlaufe. Allein es muß doch darauf hingewiesen werden, daß *Loranthus* vereinzelt bis nach Pirna in Sachsen verbreitet ist und daß die Literaturangaben von Eichenmisteln sehr oft durch das Vorkommen von *Loranthus* oder von *Viscum* auf *Loranthus* veranlaßt sind, noch viel öfter aber durch Unachtsamkeit oder das Verlassen auf das Gedächtnis und nachträgliche Notiz vermeintlich früher Beobachteten. Die Angaben der Mistel an Eichen stellen sich dann bei genauer Nachforschung als Lindenmisteln, Pappelmisteln usw. heraus.

Aber wenn auch die Angaben richtig wären, würde es sich um vereinzelte Beobachtungen handeln, die also keineswegs für die Entwicklung einer Eichenmistelrasse angeführt werden könnten.

In dem kleinen Gehölze des Calvarienberges bei Kaltern fand ich die Mistel, wie früher mitgeteilt, auf Linden, Robinien, Feldahorn, *Prunus Mahaleb* und auf Kirschbaum, aber nicht auf Eichen. In diesem Falle glaubt Heinricher die Ausbildung mehrerer Mistelrassen nebeneinander annehmen zu sollen, während er den Übergang der Mistel vom Wildapfelbaum auf Schlehen, Rosen, Besenpfrieme, Apfel in dem gleichfalls von mir früher beschriebenen kleinen Mistelgebiete bei Oberstein zugibt. Ich sehe in den beiden Fällen keinen prinzipiellen Unterschied. Wie sollte z. B. bei Kaltern eine Rasse auf dem Kirschbaum entstanden sein? Ein einziger Kirschbaum trägt 2—3 Mistelbüsche. Die erste Infektion muß von einem anderen Laubholze dort — wahrscheinlich von den massenhaft befallenen Linden — erfolgt sein. War diese Infektion möglich, so war ebenso gut eine 2. oder 3. Infektion möglich; ich nehme aber mit Rücksicht auf die Größe der Mistelbüsche es als wahrscheinlich an, daß die vorhandenen Mistelbüsche einer einmaligen Infektion zuzuschreiben sind. Kirschbaum ist ein sehr seltener Mistelträger, und die meisten Angaben von Misteln auf Kirschbaum, deren mir eine große Zahl zugegangen ist, erwiesen sich bei näherer Nachforschung durch Hexenbesen veranlaßt.

Es ist also gerade durch die Beobachtung in Kaltern bewiesen, daß der Kirschbaum in einzelnen Fällen durch eine andere Laubholzmistel infiziert werden kann. Das Gleiche gilt dort für *Prunus Mahaleb*. Die Robinie — eine ebenso wie die Linde sehr mistelholde Pflanze — dürfte aber mit allen möglichen Laubholzmisteln infiziert werden können, denn ich fand sie schon sehr oft auf einzelnen Robinien zwischen verschiedenen anderen misteltragenden Laubhölzern und habe sie auch schon mit enormem

Erfolge mit anderer Laubholzmistel infiziert, d. h. viele große Mistelbüsche erzogen.

Es ist nicht bewiesen, daß die bei Kaltern wachsenden Kirschenmisteln leichter Kirschbäume infizieren wie die dortige Lindenmistel oder Robinienmistel.

In Sárvár sind, wie ich früher zeigte, viele Holzarten von Misteln besetzt, darunter nicht nur mistelholde, sondern auch mistelablehnende, wie die Schwarzerle. Es sind fast keine Fälle bekannt, in denen die Mistel auf der Schwarzerle sicher nachgewiesen ist. Es muß in diesem Parke die Mistel erstmals von einer anderen Holzart auf die Erle übergegangen sein. Wenn dies feststeht und die Mistel das sonst nicht zu tun pflegt, muß weiter gefolgert werden, daß die befallenen Erlen besonders disponiert waren. Wenn das aber feststeht, daß die beiden Erlen dort besonders disponiert waren, einmal befallen zu werden, dann waren sie es doch wohl auch für mehrere Infektionen. Es spricht also alles dafür, dort disponierte Erlen anzunehmen, und nichts beweist die Ausbildung einer Mistelrasse. Hätte sich eine Erlenmistelrasse ausgebildet, so wären doch vermutlich auch die benachbarten Schwarzerlenbäume befallen worden. Diese fand ich aber mistelfrei.

Gerade solche holzartenreichen Parks wären auch gar nicht geeignet, Mistelrassen zu bilden, da ja diese durch fortwährende Wechselbestäubungen immer wieder erschüttelt würden.

Wie es sich mit der Schwarzerlenmistel von Sárvár verhält, so ist es auch mit der Fichtenmistel¹⁾, deren Vorkommen ich zum ersten Male bei Kaltern und später an anderen Orten nachgewiesen habe. Wie ich früher zeigte, stammt die Fichtenmistel stets von der Kiefernmistel ab und geht wieder leicht auf die Kiefer über, ja die Kiefernmistel keimt leicht auf der Fichte und dringt auch erfolgreich in die Fichte ein, so daß diese Anschwellungen macht, sie stirbt aber darnach in den allermeisten Fällen wieder ab. Wo dies auf Fichtenunterwuchs geschieht, wie ich das in Tirol im Mischwald von Kiefer und Fichte vielfach beobachtete, ist gewiß oftmals der Lichtmangel Schuld, es gibt aber auch gut belichtete Fichten unter randständigen Kiefern, auf denen die Kiefernmistel eindrang, ohne sich fortentwickeln zu können. Wir haben eine ausgeprägte Kiefernmistel vor uns! Wenn es nun im reinen, sehr ausgedehnten Kiefernmistelgebiet auf einzelnen Fichten zur Entwicklung mehrerer Mistelbüsche kommt, liegt doch die Annahme besonders disponierter Fichtenindividuen oder besonders disponierender Verhältnisse am nächsten.

Beim Bahnhof Bernau trug ein Spitzahorn, nicht weit davon eine Linde Mistelbüsche, während sonst in der Gegend die Mistel nicht selten ist auf Apfelbaum, *Sorbus Aucuparia* und *Sorbus Aria*.

Oberhalb Kohlgrub (über 900 m) trägt eine Linde Mistelbüsche. Nicht weit von ihr findet man die Mistel an Apfelbäumen, *Sorbus Aria*- und *Aucuparia*-Bäumen. Zwischen Kohlgrub und Murnau tritt hinzu die Birkenmistel (bei ca. 700 m). Aber nur zweimal unterhalb Kohlgrub

¹⁾ Die Mistel auf der Fichte. (Naturw. Zeitschr. f. Land- u. Forstw. 1906. p. 351.) Ferner in „Über die Verbreitung und Bedeutung der Mistelrassen in Bayern“. (Daselbst 1908. p. 561.) und „Die Ausbreitung der Kiefernmistel in Tirol und ihre Bedeutung als besondere Rasse“. (Daselbst 1910. p. 12.)

fand ich die Mistel auf den zahlreichen Haselnußsträuchern und nur einen kleinen Busch auf kanadischer Pappel, keinen auf Zitterpappel oder Bergahorn. Hier wäre man geneigt von einer Panaceenrasse zu sprechen, die auch leicht auf Linde und Harzbirke, schwer auf Hasel und Pappel und vielleicht gar nicht auf Bergahorn übergeht. Es bedarf aber meines Erachtens noch sehr zahlreicher Experimente — und solche hat auch Heinricher nach seinen Mitteilungen im Gange — um zu beweisen, daß eine z. B. auf Ahorn erwachsene Mistel auf diesem Eigenschaften erworben hat (und eventuell andere verloren hat), durch die sie Ahorn mit einem kleineren Kreis von Holzarten leichter befällt als die Holzart, von der sie auf Ahorn übertragen wurde.

Viscum album-Pflanzen entwickeln sich relativ selten auf *Viscum album* selbst weiter. In dem Obersteiner Mistelgebiet aber ist — was sonst nur hier und da beobachtet wurde — sehr häufig eingetreten. Daneben aber befällt die dortige Apfelmistel auch andere Holzarten: *Crataegus*, *Prunus spinosa*, *Rosa*, *Spartium Scoparium*.

Hier wäre ein Fall, in dem alles, was man für angewöhnte Mistelrassen auf bestimmten Holzarten anführen kann, auch für eine auf der Mistel selbst angepaßte Mistelrasse anführen könnte — und doch scheinen mir hierzu keine genügenden Gründe vorzuliegen, wenn man bedenkt, daß die Mistel immer und überall Gelegenheit hat, die eigene Art zu infizieren. (Auch bei einem Busche der Birkenmistel aus den Isarauen fand ich eine Menge von Mistelpflanzen auf den Sprossen der alten Mistel entwickelt, sonst beobachtet man es selten.)

Aus der großen Zahl meiner Infektionsserien geht hervor, daß es eine Menge von Holzarten gibt, die *eo ipso* (d. h. ohne Gewöhnung) für den Mistelbefall sehr disponiert sind, wie z. B. viele Nordamerikaner (die Roteichenarten entgegen den deutschen Eichen, *Fraxinus pubescens* gegenüber der deutschen Esche) oder die chinesische Balsampappel *Populus Simoni* gegenüber der amerikanischen *Populus canadicans* oder *balsamea* oder für die Kiefern- und die Tannenmistel die japanische Lärche (*Larix japonica* = *leptolepis*) gegenüber der einheimischen Lärche, um nur einige Beispiele zu nennen. Es kann daher oft schwer sein, einen „Hauptwirt“ anzugeben. Es kann z. B. sehr wohl die Mistel bei uns ursprünglich auf Eiche, Hasel oder Linde einheimisch gewesen sein und sich später auf den *eo ipso* empfänglicheren Apfelbaum weiter ausgebreitet haben, ähnlich wie das *Peridermium* von europäischer *Pinus Cembra* sich rapid auf der *eo ipso* viel empfänglicheren *Pinus Strobus* ausgebreitet hat, obwohl es in Amerika fehlt und somit vorher nie Gelegenheit hatte, die Weymouthskiefer zu befallen.

Es hat sich dagegen bei uns keine Eichenmistelrasse auf *Q. sessiliflora* oder *pedunculata* oder *Cerris* oder *pubescens* ausgebildet, während die Roteichen (*Q. rubra*, *coccinea*, *palustris*), die früher nie Gelegenheit hatten, infiziert zu werden, bei der ersten Infektion sich sehr disponiert zeigten. An Gelegenheit zur Infektion fehlte es unseren Eichen nicht; sie stehen unendlich oft in engstem Zusammenhange mit misteltragenden *Crataegus*, *Acer*, *Tilia*-Arten, Apfelbäumen usw. in Feldgehölzen, in Alleen und in Parks, und sie sind so oft schon vergeblich von Forschern infiziert worden. Ja sie werden auch da nicht befallen, wo

Viscum album sehr häufig auf *Loranthus europaeus*, der Eichen-Riemenblume, vorkommt. Vgl. T u b e u f, Das Parasitieren der Loranthaceen auf der eigenen Art oder anderen Loranthaceen. (Naturw. Zeitschr. f. Land- u. Forstwirtschaft. 1907. p. 349).

Wenn wir die Gewöhnungshypothese festhalten, könnten wir uns auch denken, daß durch einen Zwischenwirt die Tannenmistel z. B. über die japan. Lärche zur Kiefer übergeführt werden könnte und daß durch den Verlust der Zwischenglieder die trennende Fixierung vor sich ging. Allein wir wissen gar nicht, ob die Mistel ursprünglich spezialisiert war und dann ihren Wirkkreis erweiterte, um später wieder lokal begrenzte Wirtsrassen auszubilden — oder ob sie schon anfänglich viele Holzarten bewohnte.

Leider wissen wir über frühere Mistelfunde fast nichts. L i v i u s erzählt nur von der Eichenmistel, und in den Torfmooren bei Kiel wurden nur schmalblättrige Misteln gemeinsam mit Laubholzresten gefunden. V e r g e b l i c h habe ich bisher gehofft, es würden mistelzerstörte H ö l z e r gefunden (z. B. in den Pfahlbauresten) und Fingerzeige für frühere Verbreitung geben. Wir sind also zunächst auf Hypothesen angewiesen und auf die Veranstaltung sehr lange fortzuführender Versuchsreihen, die zu beweisen haben, ob die Nachkommen einer Mistel von einer selten und im allgemeinen ungern befallenen Holzart diese späterhin leichter annehmen.

H e i n r i c h e r berichtet, daß er junge Mistelpflanzen von der Weißtannenmistel auf *Abies Nordmanniana* gezogen habe. Er sagt hierzu: „Die Tannenmistel ist mit Leichtigkeit auf der Nordmannstanne aufzuziehen, welche sie normalerweise kaum je besiedelt hat und auf der sie, ohne Gewöhnung, sofort festen Fuß zu fassen vermochte. Diese Tanne wurde als Wirt sogar williger angenommen als der angestammte Wirt: *Abies pectinata*.“

Damit wäre ein Analogon geschaffen zu der von mir zuerst durch Infektionen erwiesenen Tatsache, daß sowohl *Viscum* wie *Loranthus*¹⁾ Wirtspflanzen befallen können, zu deren Befall sie in der Natur vorher Gelegenheit nicht hatten, so z. B. amerikanische Holzarten. Da *Viscum album* und *Loranthus europaeus* in Amerika fehlen, sind die ihnen gebotenen Holzarten von vornherein sehr geeignete Wirtspflanzen und ausgezeichnete Nährböden gewesen.

So geht *Loranthus europaeus* auf amerikanische und japanische Eichen verschiedener Sektionen über, während es bisher unmöglich war, ihn auf unseren Ahornarten, Pappeln, Weiden und anderen Gehölzen zu erziehen. Ich bekam nach jahrelang wiederholten Infektionsreihen nur Erfolg auf *Quercus*-Arten und schwächer auch auf *Castanea vesca*.

Dagegen zog ich die Kiefernmistel auch auf kurzadeliger *Cedrus* und auf *Larix japonica*, die Laubholzmistel auf amerikanischen Eschen, obwohl sie auf einheimischen Eschen erst einmal beobachtet wurde und dieser Fall von mir noch zu prüfen ist.

In Wirklichkeit liegt aber bei der Infektion der Tannenmistel auf Nordmannstanne ein solches Analogon nicht vor.

¹⁾ Infektionsversuche mit *Loranthus europaeus*. (Naturw. Zeitschr. f. Land- u. Forstw. 1907. p. 341.)

Denn die Nordmannstanne zählt ja auch in ihrer Heimat zu den Wirtspflanzen der Tannenmistel, wie schon Köppen für das Rion-Gebiet nach Ssredinsky angab (1888).

Um hierüber volle Sicherheit zu haben, wendete ich mich an Herrn Kollegen Rikli-Zürich nach seiner im Sommer 1912 unternommenen Kaukasusfahrt, an der zu beteiligen mir leider nicht möglich war. Rikli antwortete mir: „Nach meinen Tagebuchnotizen habe ich *Viscum* auf *Abies Nordmanniana* im Klytschtal, oberer Teil des Kodortales (Abchasien, Hinterland von Ssuchum Kali, am Weg zum Klughorpaß) in einer Höhe von ca. 1350 m vorgemerkt.“

Die Nordmannstanne steht der *Abies pectinata* außerordentlich nahe und teilt auch andere Wirte mit dieser Art, so z. B. bilden beide den von *Melampsorella Caryophyllacearum* verursachten Hexenbesen, was auch die anderen in diesen Verwandtschaftskreis gehörigen Tannen tun, so *A. Cephalonica* und *A. Pinsapo*. Allerdings geht der Parasit auch auf andere Tannen über, wie *A. balsamea*, die den ersteren in dieser Beziehung also auch näher steht.

Ich fand im feuchten Sommer 1912 auch zum ersten Male, daß *Trichosphaeria parasitica* auf *Abies Nordmanniana* auftrat und zwar bei Inzigkofen in Württemberg und bei Grafrath in Oberbayern. Das letztere beweist, daß eine sonst gegen bestimmte Parasiten gefeite Holzart durch äußere Verhältnisse plötzlich disponiert werden kann.

Im übrigen habe ich schon vor Heinricher Infektionen der Nordmannstanne vorgenommen und zwar April 1907¹⁾. Aus diesen wie aus späteren Infektionen sind beblätterte Mistelpflanzen erwachsen. Die dickere, weichere Rinde und das üppigere Wachstum, was die Nordmannstanne besonders in der Jugend und was sie auch in Kultur (vor allem in der Kultur in Kübeln und gar im Glashause) der einheimischen Tanne gegenüber zeigt, macht es begreiflich, daß auf ihr die Mistel bei künstlicher Infektion noch üppiger gedeiht.

Auch auf *Abies cephalonica* kommt die Tannenmistel in der Heimat vor.

Interessanter scheint es mir zu sein, daß nach meinen Infektionsversuchen mit Tannenmisteln auch die nordamerikanische Balsamtanne (*Abies balsamea*) ein guter Mistelwirt ist. Ich habe auf ihr mehrere Mistelbüsche gezogen. Diese Misteln zeichnen sich nur durch sehr schmale Blätter aus.

Dieses beweist, daß auch die Tannenmistel Tannenarten befallen kann, zu deren Befall sie vorher niemals Gelegenheit hatte.

Und noch weit interessanter ist es, daß es mir, wie oben angedeutet, auch geglückt ist, die Tannenmistel auf der japanischen Lärche, *Larix japonica* oder *leptolepis* aufzuziehen.

Die japanische Lärche ist demnach ein guter Mistelwirt für die Tannenmistel und, wie ich früher zeigte, auch für die Kiefern- mistel, während die einheimische Lärche, *Larix europaea*, beide ablehnt. Die Laubholzmistel geht dagegen nicht auf die japanische

¹⁾ S. die Varietäten oder Rassen der Mistel. (Diese Zeitschr. 1907. p. 340.)

Lärche über und ebensowenig *Viscum cruciatum*, welches eine entschiedene Laubholzmistelart ist.

Ich habe zuerst in meinem Buche über Pflanzenkrankheiten 1895. p. 343 auf die Analogie der Mistelrassenbildung mit der Bildung von biologischen Rassen bei den Uredineen hingewiesen und dort schon bezüglich der Rostpilze auf Grund meiner Infektionsversuche mit Gymnosporangien angeführt, wie man sich das Entstehen biologischer Rassen denken kann. Es heißt p. 343: „Die strengen Parasiten, zu denen hauptsächlich die Uredineen gehören, zeigen enge Anpassungen an ihre Wirtspflanzen. Bei den polyxenen Arten scheinen sich nun auch noch *Standortsformen* — wobei der Standort eben in der Wirtspflanze besteht — auszubilden. Ich habe früher gezeigt¹⁾, daß man bei *Viscum album* solche Formen bei *Pinus*, *Abies* und den Laubhölzern annehmen kann, während andere (*Gandoger*) das *Viscum* in zahlreiche Spezies trennten. *Magnus*²⁾ nennt solche Formen der heteröischen Uredineen „Gewohnheitsrassen“, die sich lokal an bestimmte Arten ihrer verschiedenen Wirtspflanzen für die *Aecidium*generation gewöhnt haben.....

Magnus hält ebenso das *Aecidium Convallariae* auf seinen verschiedenen Nährpflanzen für das *Aecidium* derselben, auf *Phalaris arundinacea* vorkommenden, *Puccinia*. Vielleicht kommt ähnliches vor bei den Nadel-Peridermien auf *Pinus*, die von den *Coleosporien* sehr verschiedener Pflanzen erzeugt werden, und zwar bald nur von der einen, bald nur von der anderen. Den Weg, wie solche Anpassungen zustandekommen können, zeigen die Infektionsversuche mit Gymnosporangien an. So infiziert *G. clavariaeforme* immer erfolgreich und normal *Crataegus*, nebenbei aber und zwar mit unvollkommener Entwicklung des Pilzes resp. der *Aecidien* *Sorbus* und *Cydonia*. Bei letzterer Art erhielt *Peyritsch* sogar ausgebildete Peridien. Es kann sich hier also sehr leicht eine Form ausbilden, die lokal hauptsächlich *Crataegus* und eine, die hauptsächlich *Cydonia* infiziert...“ (Dem habe ich heute nebenbei berichtend beizufügen, daß nach meinen Infektionsversuchen mit *G. tremelloides* sich auf *Sorbus Aria* viele *Aecidien*, bei Apfelbaum nur *Spermogonien* bildeten. Die Infektionspflanzen des Apfelbaums waren meist Keimlinge, bei denen nur die *Cotyledonen* und *Primärblätter* infiziert wurden. Das scheint beachtenswert zu sein, weil die *Primärstadien* vielleicht abgesehen von ihrer Zartheit aus atavistischen Gründen größere Empfänglichkeit zeigen und dadurch die nähere Verwandtschaft der Parasiten (hier von *Gymnosporangium*-Arten) anzeigen können. Wie ich ebenfalls früher zeigte, kann man mit *Gymnosporangium Sabiniae* die zur Apfelbaumgruppe gehörigen *Pirus*-Arten von den zur Birnbaumgruppe gehörigen ebenso trennen, wie mit *Gymnosporangium conicum* den *Sorbus Aucuparia* und *Aria*, während Bastarde infiziert werden.)

Ob sich Pilz-Rassen durch „Angewöhnung“ an bestimmte neue Wirtspflanzen bilden und dabei Eigenschaften der ursprünglichen Wirtspflanze gegenüber mehr oder weniger verlieren können, ist experimentell auch noch zu wenig studiert.

¹⁾ Botan. Centralbl. 1889.

²⁾ Hedwigia 1894. p. 77.

Bei den Rostpilzen hat Klebahn hierzu einen Versuch gemacht, der aber allein und bei kurzer Dauer noch nicht ausreichend zu sein erscheint. Im übrigen teile ich den Standpunkt Klebahns vorerst, daß auch die biologischen Merkmale der Pilze von großer Konstanz seien und eine rasche Ausbildung von „Gewohnheitsrassen“ durch zufällige An- oder Abwesenheit von Nährpflanzen nicht eintritt.... und „daß gewisse, auf unbekannten inneren Verhältnissen beruhende Entwicklungstendenzen, die allerdings durch die äußeren Umstände beeinflußt werden können, für die Entstehung der Formen maßgebend sein müssen“ (Klebahn, Die wirtswechselnden Rostpilze. 1904. S. 161).

Wir stehen hier auch vor ähnlichen Problemen wie es die Erfahrungen über die physiologischen Rassen der Waldbäume uns aufgeben. Durch die interessanten Versuche besonders von Cieslar und A. Engler hat sich ergeben, daß die verschiedenen Hochlagen der Berge Fichten von verschiedener Wachstumsintensität tragen und daß sich diese Differenzen beim gemeinsamen Anbau in der Ebene erhalten. Man kann annehmen, daß die Fichten diese Eigenschaften bald annehmen und noch nicht allzu lange besitzen und daß sie sie ebenso leicht wieder verlieren. Es wäre dies analog der Erscheinung, die man seit Schübeler beim Getreide kennt, welches seine späten Eigenschaften, die es im Norden (Norwegen) angenommen hat, beim Anbau in unseren Breiten einige Generationen hindurch bewahrt, dann aber verliert. Es wären also diese physiologischen Eigenschaften vererbbar, aber nicht sonderlich gefestigt, mehr nur ein Nachklingen. Es ist aber auch möglich, daß schon bei der Nachwanderung beim Rückgang des Eises zur Eiszeit bestehende Fichtenrassen verschiedene Bergregionen besiedelten und also dauerhafte Rassen darstellen. Eine Bastardierung ist bei den extrem auseinanderliegenden Rassen nicht gut möglich, weil die Blütezeit von den Fichten der Ebene und jener der Berghöhen um mehrere Wochen auseinanderliegt. Auch bei der Laubholzmistel wäre die Frage zu stellen, ob die eventuelle Angewöhnung ein Nachklingen oder eine gefestigte Eigenschaft wäre.

Man kann zurzeit unterscheiden:

1. Holzarten, in welche Mistelkeimlinge leicht eindringen
 - a) und sich gut weiterentwickeln,
 - b) sich aber schwer oder gar nicht weiterentwickeln.
2. Holzarten, in welche Mistelkeimlinge schwer eindringen, sich schwer oder gar nicht weiterentwickeln.
3. Holzarten, in welche Mistelkeimlinge gar nicht eindringen.
 - 1a. wären mistelholde Pflanzen,
 - 1b und 2. mistelabweisende Pflanzen und Gelegenheitswirte.
3. Unangreifbare Pflanzen.

Beispiele: ad 1a 2nadelige Kiefern für Kiefernmistel, ebenso *Larix leptolepis*.

ad. 1b. *Cytisus Laburnum* und *Rhamnus Frangula* sind abweisend, *Prunus Padus* nur Gelegenheitswirt, obwohl Laubholzmistelkeimlinge leicht eindringen.

- ad 2. Fichte ist Gelegenheitswirt, in den die Keimlinge der Kiefernmistel schwer eindringen.
- ad 3. *Pinus excelsa*, deren Periderm von der Kiefernmistel nicht durchbrochen wird.

Für den Mistelbefall kommt aber in Betracht:

1. Die Verbreitung durch Vögel.
 - a) Die Vogelart.
 - b) Die wechselnde Gepflogenheit derselben besonders bei Wechsel der Holzarten und des Standortes.
2. Die Empfänglichkeit der Holzart.
 - a) Durch innere Eigentümlichkeiten.
 - b) Durch Wachstumsverschiedenheiten infolge äußerer Ursachen. Ja es können sogar einzelne Zweige, z. B. durch Callusbildung, besonders disponiert sein.
3. Die Anpassung durch Gewöhnung mit gleichzeitiger Minderung der Anpassung an andere Holzarten.
 - a) Diese kann nur schwach gefestigt, nur ein Nachklingen sein,
 - b) gefestigt und dauernd vererbbar sein.
 - c) Sie kann alteriert werden durch Bastardierung.

Die Differenz in der Anschauung, die Heinricher und ich über die Mistelrassenbildung innerhalb der Laubholzmistel haben, besteht nicht bezüglich der Möglichkeit der Entstehung solcher Rassen, sondern nur bezüglich der Meinung, ob ihr Nachweis bereits genügend sicher erbracht ist. Noch glaube ich keine Veranlassung zu haben, meine skeptische Haltung aufzugeben.

Zum Schlusse möchte ich nicht unerwähnt lassen, daß auch Heinricher die Disposition der Holzarten und die Bastardierung der Mistelrassen in den Bereich seiner Besprechung, aber hierbei nicht die gleichen Schlüsse zieht. Im übrigen nehme ich hier nur auf meine eigenen Befunde Bezug, ohne jene der Literatur bei dieser Gelegenheit einzubeziehen. Hierzu hoffe ich später bei der geplanten Mistelmonographie zu kommen.

Resultate künstlicher Infektionsversuche.

Die Mistelinfectionen vor 1905 sind größtenteils mit Apfelbaummisteln auf Laub- und Nadelhölzern ausgeführt worden und ergaben auf den meisten Pflanzen im Garten keinen dauernden Erfolg; bis auf mehrere Exemplare auf *Crataegus oxyacantha*-Pflanzen, von denen eine sich bis heute erhalten hat, auf Apfelbaum und *Sorbus aucuparia*. Eine Reihe von 1905 wurde mit der Mistel vom Spitzahorn eingeleitet. Daneben laufen mehrfache Einzelinfectionen. Die späteren Versuche sind in größerem Maßstabe durchgeführt und hatten folgende Ergebnisse (s. die folgenden Tabellen).

Weitere Schlüsse aus diesen Versuchen zu ziehen, behalte ich mir für eine andere Gelegenheit vor. Jedenfalls berechtigen aber meine bisherigen Infektionsresultate zu meinem Standpunkte, mit einer bestimmten Stellungnahme zu der Frage, wie weit Rassenbildung innerhalb der Laubholzmistel anzunehmen ist, bis zum Abschlusse weiterer, von Heinricher und mir bereits angestellter Versuche noch zu warten.

Kiefernmistel. Infektion vom April 1906 im Kaltbause.

Erste Revision: 26. Mai 1907

Zweite Revision: Juni 1908

Revision 1911

Auf Nadelhölzern:

1. auf *Abies peotinata*, 1 Keimling noch grün, lebend, 4 vertrocknet, einer lebend abgeschnitten,
2. auf *Abies Nordmanniana*, 1 liegt frei (ohne Haftscheibe), am 1. Juni lebend, einer lebend angeheftet, 2 vertrocknet,
3. auf *Pinus excelsa*, 1 frisch lebend, 1 weniger prall, 1 kürzlich vertrocknet (war nicht eingedrungen!), 4 vertrocknet,
4. auf *Pinus Laricio*, 1 ist lebend, aufgerichtet, 1 ist lebend grün, 1 von Zwillingen lebt, der andere ist tot.
5. *Pinus montana*, 2 Keimlinge sind frisch, lebend; ein anderer wurde im April lebend abgeschnitten, er war in die Rinde eingedrungen,
6. *Pinus resinosa*, 1 Keimling ist lebend, an einer anderen Pflanze waren 3 Keime eingedrungen, die Pflanze starb aber ab,
7. *Picea excelsa*, 1 Keimling ist lebend, aufgerichtet, aber die Fichte hat alle alten Nadeln abgeworfen, da sie von Schildläusen und *Tetranychus* leidet. Ein Keimling auf einer anderen Fichte wurde im April abgeschnitten, er war eingedrungen, ein anderer ist vertrocknet,
8. *Larix japonica*, 1 Keimling lebt gut,
9. *Cedrus atlantica*, 1 Keimling lebt gut,
10. *Pseudotsuga Douglasii*, 1 Keimling, ist Ende Mai vertrocknet, ohne Eindringen zu sein, ein zweiter ist grün und frisch,
Keime an *Taxus*, *Ginkgo*, *Chamaecyparis* sind vertrocknet.

- | | |
|--|--|
| 1. Keimlinge eingedrungen und vertrocknet, | 1. — |
| 2. Keimlinge eingedrungen und vertrocknet, | 2. — |
| 3. Keimlinge oberflächlich vertrocknet, | 3. — |
| 4. 3 beblätterte Mistelpflanzen, | 4. eine Mistelpflanze ist weiter gewachsen, |
| 5. 2 beblätterte Mistelpflanzen mit je 2 Blättchen, | 5. die Mistelpflanzen entwickelten sich gut, bis der Wirt im Gewächshause abstarb, |
| 6. Keimling mit 2 Blättchen, 2 Adv.-Wurzeln in der Luft starke Anschwellung, | 6. der Keimling brach ab, die Anschwellung besteht noch 1912, |
| 7. ein Keimling lebt noch aufgerichtet, | 7. Wirt im Gewächshaus abgestorben, |
| 8. Keimling mit 2 Blättern, | 8. die Mistel hat 1911 3 Äste mit 9 Blättern, |
| 9. der Keimling lebt noch, ohne Blätter gebildet zu haben, | 9. die Mistel hat sich aus einem Ausschlage entwickelt und besitzt 1911 4 Blätter. Das Hypocotyl ist unverändert erhalten, |
| 10. Keimling vertrocknet, | 10. — |

C. von Tubeuf,

Kiefernmistel. Infektion vom April 1906 im Kalthause.		
Erste Revision: 26. Mai 1907	Zweite Revision: Juni 1908	Revision 1911
Auf Laubhölzern:		
11. An 2 Linden, die an Ostern 1906 mit der Kiefern- mistel infiziert worden waren, befanden sich Ende März 1907 4 angeheftete, vertrocknete Keimlinge und ein noch lebender, welcher aber frei in der Luft hing. Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß die Haftscheibe zwar festgeheftet war, daß aber das Periderm der nunmehr zweijährigen (bei der Infektion einjährigen) Linden Zweige nicht durch- brochen wurde. Im Holz der Linden Zweige waren unterhalb der Haftscheibe gebräunte Partien zu bemerken).	11. Alle Keimlinge wieder ver- trocknet,	11. —
12. an einer <i>Sorbus-Aucuparia</i> -Pflanze be- fanden sich 2 Keimlinge der Kiefern- festsaßen, aber vertrocknet waren, ohne das Peri- derm zu lösen,	12. —	12. —
13. an <i>Populus balsamea</i> hatte ein Same 2 Keimlinge gebildet, von denen einer vertrocknete, der andere, der an dem Stämmchen lang hinkroch, erschien am 26. Mai noch grün,	13. Ein Keimling lebt noch ohne Blätter.	13. Das hypokotyle Glied lebte über 4 Jahre und starb im Sommer 1911 ab.
14. ein Keimling auf <i>Castanea vesca</i> lebt noch. Solche auf verschiedenen Eichen, Oleander, <i>Rhododendron ponticum</i> , Ahorn, Ri- bes usw. vertrockneten.	14. Keimlinge vertrocknet.	14. —
15. (auf <i>Populus nigra</i> lebt noch ein Keim- ling von Zwillingen.) Blätter hat von allen vorjährigen Keimlingen noch keiner gebildet.	15. —	15. —

Ann.: Misteln auf No. 4, 8, 9 sind Winter 1912/13 noch in gutem Zustande.

Kiefernmistel. Infektion Frühjahr 1907. Glashaus.

Rev. 6. Juni 1908.

Rev. Nov. 1911 u. 12.

- | | | |
|----------------------------------|--|---|
| 1. 2 <i>Populus balsamea</i> . | 1. a—b. 1 Keimling lebt noch | 1. 2. 3. — |
| 2. 3 Linden | 2. 1 Keimling lebt noch, 3 sind vertrocknet | |
| 3. <i>Abies Nordmanniana</i> | 3. Keimlinge vertrocknet | |
| 4. 4 <i>Pinus spec.</i> 2 nadel. | 4. a) 2 Keimlinge lebend, einer gegabelt mit 2 Infektionen | 4. a) Eine beblätterte Mistelpflanze u. 1 aufgestellter Keimling, 1912: 2 beblätterte Pflanzen |
| | b, c, d teils grün, teils vertrocknet | b) —
c) mit einem aufgestellten Keimling 1911, mit 2 Blättchen 1912
d) mit einem aufgestellten Keimling auf schwacher Anschwellung 1912 |

Kiefernmistel. Infektion 9. März 1909. Glashaus. 3jährig. Beilngries.

- | | |
|---|--|
| 1. Auf denselben <i>Pin. spec.</i> Pflanzen wie 4 der vorigen Reihe | 1. = 4 vorstehend |
| 2. <i>Abies pectinata</i> und <i>Ab. Nordmanniana</i> | 2. — |
| 3. <i>Larix europaea</i> | 3. Wirt abgestorben |
| 4. <i>Taxus baccata</i> | 4. — |
| 5. <i>Pseudotsuga Douglasii</i> | 5. Wirt abgestorben |
| 6. 2 <i>Populus balsamea</i> | 6. — |
| 7. Linde | 7. 1 Keimling mit gelappter Haftscheibe noch 1912 vorhanden |
| 8. „ | 8. 1 Keimling anliegend, lebt noch 1912 |
| 9. 2 Fichten | 9. Die Haustorien waren eingedrungen, Wirt abgestorben |
| 10. <i>Picea</i> (wohl <i>alba</i>) | 10. ein aufgestellter Keimling, dessen Kopf 1912 vertrocknet und dessen Basis verdickt ist |

(Kiefernmistel-Infektion 30. Jan. 1908. Mistel von Germersheim. *Abies Nordmanniana*, *Picea excelsa* u. 2 gem. Kiefern, alle Wirte abgestorben. — *Salix caprea*, hierzu bes. Notiz später!)

Fichtenmistel von Beilngries. Infektion 10. Dez. 1907.

Letzte Rev. Nov. 1911 u. 12

- | | |
|---|---|
| 1. <i>Abies pectinata</i> | 1. — |
| 2. <i>Pinus silvestris</i> 3 Pflanzen
Dieselbe vom 30. Dez. 1907 | 2. a) 4 beblätterte Mistelpflanzen
b) 2 andere Kiefern mit 2 Mistelpflanzen starben ab |
| 3. Auf <i>Abies concolor</i> | 3. Keimlinge, die lange lebten, starben ab |
| 4. <i>Cedrus atlantica</i> | 4. — |
| 5. Auf <i>Pinus spec.</i> 2 nadel. | 5. 3 beblätterte Mistelpflanzen |
| 6. <i>Picea alba</i> | 6. Keimlinge vertrocknet. |

No. 2a u. 5 godiehen während des Jahres 1912 weiter.

Tannenmistel. Infektion vom 26. April 1907 im Glashause.		Revision Nov. 1911 u. 12	
1. Rev. 6. Juni 1908		1. a) Wirt abgestorben	
1. Drei <i>Abies Nordmanniana</i>	1. a) 1 Keimling lebend, mehrere vertrocknet b) 2 Keimlinge lebend, mehrere vertrocknet	b) Eine Mistelpflanze mit 8 Blättern, eine mit 6 Blättern (u. 1 Keimling aufgestellt. Von einer Nachinfektion von 1910)	
	c) 2 Keimlinge lebend, mehrere vertrocknet	o) (3 Keimlinge aufgestellt von der Nachinfektion 1910, ohne Blätter)	
2. <i>Abies balsamea</i>	2. 3 Keimlinge lebend, Zweiganschwellung	2. Wirt abgestorben	
3. <i>Pinus Banksiana</i>	3. 3 Keimlinge lebend	3. —	
4. <i>Pinus</i> sp. 2 nadel.	4. 2 Keimlinge vertrocknet	4. Wirt tot	
5. <i>Picea excelsa</i>	5. ?	5. —	
6. <i>Picea sitchensis</i>	6. 1 Keimling lebend, aber nicht eingebrungen, 4 vertrocknet	6. —	
7. <i>Larix japonica</i>	7. 1 Keimling lebend auf Anschwellung	7. 1 Mistelpflanze mit 2 Blättern (und 1 Keimling ohne Blätter aufgestellt von der Nachinfektion 1910)	
8. <i>Tilia grandifolia</i>	8. 1 Keimling vertrocknet	8. —	
9. <i>Populus balsamifera</i>	9. 2 Keimlinge grün, aber schlaff	9. —	
10. <i>Cytisus Laburnum</i>	10. 3 Keimlinge lebend, 4 vertrocknet	10. —	
11. <i>Sorbus Aria</i>	11. 1 " " 4	11. —	
12. <i>Acer Pseudoplatanus</i>	12. 3 " " 2 noch grün, andere tot	12. —	
13. <i>Corylus Avellana</i>	13. 2 Keimlinge lebend	13. —	
Tannenmistel. Infektion am 26. März 1909. Glashaus.		Letzte Rev. Nov. 1912	
1. <i>Abies pectinata</i>		1. 3 schön aufgestellte Keimlinge mit Anschwellung u. 1 beblätterte Pflanze	
2. <i>Abies pectinata</i>		2. 1 Mistelpflanze mit 1 Blättern, Wirt aber kümmernd	
3. <i>Sorbus Aucuparia</i>		3. —	
4. 4 Kiefernpflanzen		4. —	
5. Eine <i>Pinus silvestris</i>		5. —	

Pappelmistel von der Schwarzpappel.

Infektion am 13. März 1908

Erfolg bis Nov. 1912

Auf 1. <i>Populus candicans</i>	1. —
„ 2. „ <i>alba</i>	2. Wirt starb ab
„ 3. „ <i>tremula</i>	3. —
„ 4. „ <i>Simonii</i>	4. Eine Anzahl von Mistelbüschen
„ 5. „ <i>nigra pyrami-</i>	5. —
„ <i>dalis</i>	

Birnenmistel

Infektion am 17., 20. u. 30. Dez. 1907

Erfolg bis Nov. 1912

Auf Apfelbaum	Eine Anzahl von Mistelpflanzen auf großen Anschwellungen
„ Birnbaum	Der Mistelschleim tötet alle infizierten Ästchen
„ Linde	2 Keimlinge mit 2 kl. Blättchen.
(Apfelmistel auf Birne verhielt sich wie die Birnenmistel, ebenso die meisten Infektionen mit <i>V. cruciatum</i> .)	

Spitz-Ahornmistel. Infektion Frühjahr 1905.

Versuchsfeld Bernau.

Tanne, Lärche, Fichte, Kiefer, Birke, Spitzahorn, Vogelbeere, Erle, Sahlweide, Buche, Eiche, Ailanthus	Die Keimlinge waren nur am Ahorn grün und frisch, gingen aber später ein, wohl wegen Lichtmangel (der Ahorn stand unter Laubholz)
--	---

Apfelbaummistel von Ebenhausen 14. Dez. 1907.

19. Okt. 1908

Versuchsfeld Bernau

<i>Pinus Laricio</i>		Die Infektionen ergaben keinen bleibenden Erfolg (1912)
„ <i>Cembra</i>	1 K. tot	
„ <i>Strobus</i>	1 K.	
„ <i>Banksiana</i>	—	
„ <i>silvestris</i>	2 K. tot	
<i>Picea obovata</i>	—	
„ <i>Glehni</i>	—	
„ <i>nigra</i>	—	
„ <i>orientalis</i>	1 K. tot	
„ <i>alba</i>	1 K. tot	
„ <i>pungens</i>	1 K. tot	
„ <i>excelsa</i>	1 K. tot	
<i>Betula verrucosa</i>	5 K. tot	
<i>Sorbus Aucuparia</i>	3 K. — 4 K. — 1 K. — 3 K. — 1 K.	
<i>Rhamnus Frangula</i>	4 K. — 4 K. — 1 K.	
<i>Acer platanoides</i>		
<i>Quercus pedunculata</i>	4 Keiml.	
Aspe	2 K.	
Birke	3 K. — 2 K.	
<i>Abies concolor</i>	1 Zwilling	
„ <i>balsamea</i>	1 K.	
„ <i>firma</i>	1 K. tot	
„ <i>pectinata</i>	1 Zwilling gut	
„ <i>cilicica</i>	1 K. gut	
„ <i>Mariesii</i>	—	
„ <i>Nordmanniana</i>	—	
„ <i>grandis</i>	—	
„ <i>brachyphylla</i>	1 K. gut.	

Apfelbaummistel von Ebenhausen.

Infektion in Füssen im Garten, Ostern 1907.

Rev. 18. April 1909

Sept. 1909

<i>Abies Nordmanniana</i> , 1 K. tot	
<i>Fagus silvatica</i> , 1 Zwillling tot	
<i>Ligustrum vulgare</i> , 2 K. lebend, 2 tot	
<i>Cornus alba</i> , 1 von Zwillling lebend, 1 tot	
<i>Caragana arborescens</i> , 1 von Zwillling lebend, 2 tot	
<i>Acer Negundo</i> , 1 von Zwillling lebend	
<i>Cytisus alpinus</i> , 1 von Zwillling lebend, 2 tot	2 lebend
<i>Ulmus</i> , 5 lebend, 1 tot	—
<i>Fagus silvatica</i> , 2 lebend	eine Keimscheibe noch zu sehen
<i>Prunus Padus</i> , 1 tot	
<i>Acer platanoides</i> , 1 lebend, 1 tot	
<i>Alnus incana</i> , 1 tot	
<i>Ulmus</i> , 1 lebend, 1 tot	1 tot
<i>Acer platanoides</i> , 1 lebend, 2 tot	
<i>Caragana arborescens</i> , 1 tot	tote Keimscheibe
<i>Alnus glutinosa</i> , 1 tot	
<i>Ulmus</i> , 1 lebend, 1 tot	1 lebend, 1 tot
<i>Larix europaea</i> , 1 tot	—
<i>Prunus Padus</i> , 1 tot	
2. <i>Populus pyramidalis</i> , 1 le- bend, 2 tot	1 lebend
<i>Evonymus europaeus</i> , 1 abster- bend	—
<i>Acer platanoides</i> , 1 lebend, 1 tot	—
<i>Cytisus alpinus</i> , 1 lebend, 1 tot	1 lebend, 1. tot
<i>Ligustrum</i> , 1 lebend, 1 tot	
<i>Viburnum Opulus</i> , 1 lebend, 2 tot	
<i>Sorbus Aucuparia</i> , 1 lebend, 3 tot	1 lebend
<i>Pinus Banksiana</i> , 1 tot	—

Im Sommer 1912 war
als einziges Resultat die kleine, be-
blätterte Mistel-
pflanze auf dem
verdickten Aste von
*Sorbus Aucu-
paria* übrig ge-
blieben, kein ande-
rer Keimling hatte
es bis zur Entfal-
tung von Blättern
gebracht.

Sept. 1910, 11 u. 12
eine kleine beblät-
terte Mistelpflanze

Spätinfektion von *Prunus Padus* 26. Juni 1907 im Glashause.

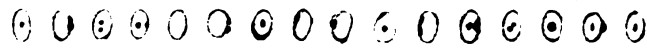
Beeren am Baum begannen schon innerhalb der Schale zu keimen.

Rev. 6. Juni 1908

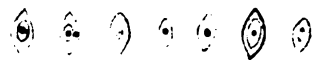
Auf: 1. <i>Picea excelsa</i> u. <i>alba</i>	1. Keimlinge vertrocknet
2. <i>Abies pectinata</i>	2. 2 Keimlinge lebend
3. „ <i>Nordmanniana</i>	3. 1 „ „
4. „ <i>balsamea</i>	4. Keimlinge vertrocknet
5. <i>Ginkgo biloba</i>	5. „ „
6. <i>Pinus</i> sp. 2 nadel.	6. „ „
7. <i>Pinus Strobus</i>	7. —
8. <i>Fagus silvatica</i>	8. Keimlinge vertrocknet
9. <i>Sorbus Aucuparia</i>	9. —
10. <i>Tilia parvifolia</i>	10. 1 Keimling lebend, einer tot
11. <i>Prunus serotina</i>	11. 2 Zwillinge u. 1 einzelner lebend
12. <i>Juglans nigra</i>	12. —
13. <i>Larix japonica</i>	13. Einer noch lebend
14. <i>Olea europaea</i>	14. 3 noch lebend (5 hatten gefaßt und vertrocknet dann), einer hängt lebend in der Luft
15. <i>Castanea vesca</i>	15. —

Letzte Rev. Nov. 1911.

Alle Keimlinge sind abgestorben.



B. anthracis ($\frac{1}{2}$ Jahr alt).



Ein unbekannter Bodenbazillus (4 Monate alt).



B. subtilis ($\frac{1}{2}$ Jahr alt).



B. tetani (frisch)



B. tetani (20 Jahre alt).



B. mycoides ($\frac{1}{2}$ Jahr alt).



B. megatherium (2 Monate alt).

Apfelbaum mistel. Infektion am 25. resp. 30. April 1907 im großen Glashause.			Rev. 6. Juni 1908	letzte Revision Nov. 1912
Auf				
1. a) <i>Abies Nordmanniana</i>	1. a) 1 Keimling lebend, 4 vertrocknet	1. a u. b —		
b) <i>Abies balsamea</i>	b) alle abgestorben, einer schlaff, grün	2. —		
2. <i>Larix japonica</i>	2. 1 Keimling lebend, 4 tot	3. —		
	3. 2 „ „ aber nicht frisch, 4 tot			
4. <i>Pinus Banksiana?</i>	4. 1 Keimling lebend, andere tot	4. —		
5. <i>Pinus silvestris</i>	5. —	5. —		
6. <i>Picea pungens</i>	6. —	6. —		
7. <i>Picea excelsa</i>	7. 1 lebend, andere tot	7. —		
8. <i>Picea sitchensis</i>	8. —	8. —		
9. <i>Populus balsamea</i>	9. —	9. —		
10. <i>Corylus Avellana</i>	10. 3 Keimlinge lebend	10. Topf mit 4 Pflanzen. Eine Pflanze mit 1 aufgestelltem Keimling u. 2 lebenden, anliegenden, eine mit 1 toten Keimling		
11. Linden	11. eine mit 4 vertrockneten Keimlingen, die nicht faßten eine mit 3 lebenden Keimlingen „ 1 „ „ „ 1 „ „ „ 1 „ „	11. 1. Topf mit 3 Linden. 2 Pflanzen ohne Misteln. Die 3. Pflanze mit 2 beblätterten Mistelpflanzen. 2. Topf mit 3 Linden. Auf der einen eine kleine bebl. Mistelpflanze auf starker Anschwellung, auf der 2. Anschwellung mit 1 unbeblättertem Keimling. 3. Topf mit 3 Linden. Eine mit einer beblätterten Mistelpflanze u. großer Anschwellung; eine mit aufgestelltem Keimling und eine ohne etwas.		

Lindenmistel. Infektion April 1906 im Garten.

Gleichzeitig mit den Infektionen, die mit Kiefernmistel aus Bozen auf Topfpflanzen im Gewächshause ausgeführt wurden, machte ich auch (im April 1906) Infektionen mit der *L. in demisteli* aus Kältern auf Topfpflanzen im Freien. Dieselben wurden auch im Freien überwintert und nur die Blumentöpfe durch eine dicke Laubumhüllung geschützt. Leider litten die Nadelholzer durch schweflige Säuren.

Revision der Lindennistinfektionen ergab Mitte Juni 1907 auf:

		2. Revision Juni 1908	Letzte Revision Nov. 1911
1. Bergahorn:	1 Zwillingsskeimling, beide lebend,	1. Ein Keimling lebt noch	1. —
2. Prunus Padus:	2 Keimlinge tot, 1 Zwillingsskeimling, beide lebend, 1 Zwillingsskeimling, einer davon lebend,	2. 2 Keimlinge leben noch	2. —
3. Salix Caprea:	1 Keimling, lebend. 1 Keimling, tot, 1 Zwillingsskeimling, beide lebend.	3. Beide Keimlinge eines Zwillings beblättert	3. —
4. Cytisus Laburnum:	2 Zwillingsskeimlinge, alle 4 lebend.	4. 1 Zwillingspaar lebt noch	4. —
5. Sorbus Aria:	1 Keimling, tot, ein anderer Anfang Juni abgestorben und mit Nectria-Konidien-Polstern bedeckt.	5. Nur noch eine Anschwellung vorhanden	5. Eine große Mistelpflanze vom Stamm
6. Fagus silvatica:	1 Keimling, lebend. 1 Zwillingsskeimling, einer lebend.	6. Ein Keimling lebt noch	6. —
7. Populus balsamea:	1 Keimling, tot.	7. —	7. —
8. Weißtanne	1 Keimling, tot.	8. —	8. —

Endresultate der Mistelinfectionen nach mindestens 5 sommerischem Leben der jungen Keimpflanzen.

Demnach wurden beblätterte Mistelpflanzen erzogen

mit Kiefernmistel auf:

Pinus silvestris,
„ *Laricio*,
„ *montana*,
„ sp. 2 Nadler,

Larix japonica,
Cedrus atlantica,
(*Salix Caprea*)

mit Fichtenmistel auf:

Pinus silvestris,
„ *resinosa*

mit Tannenmistel auf:

Abies pectinata
„ *Nordmanniana*
„ *balsamea*
Larix japonica
(*Acer dasycarpum*)

Eichenmistel:

Fraxinus cinerea
Sorbus Aucuparia

Lindenmistel:

Sorbus Aria
Salix Caprea

mit Apfelbaummistel auf:

Populus tremula,
Quercus rubra,
Acer dasycarpum,
Sorbus Aucuparia,
Fraxinus cinerea,
Crataegus oxyacantha,
Betula verrucosa (älterer Versuch im Garten),

Tilia,
Salix Caprea,
Pirus Malus

(? *Robinia Pseudacacia*?
könnte auch Pappelm. gewesen sein?)

Pappelmistel:

Populus Simonii

Birnenmistel:

Tilia
Pirus Malus

Nachdruck verboten.

Kleinere Mitteilungen über die Nonne und deren Feinde.

Von Dr. Bruno Wahl, Wien.

Berichtigung.

Infolge eines Mißverständnisses in der Korrespondenz mit Herrn Dr. Fr. Ruschka, welcher für die k. k. Pflanzenschutzstation in Wien verschiedene Chalcididen in liebenswürdigster Weise zu bestimmen übernommen hatte, habe ich in meinem oben benannten Artikel im 35. Bd. dieser Zeitschrift, 2. Abt. p. 199 (1912) eine Chalcidide als *Monodontomerus dentipes* bezeichnet; es hat sich aber tatsächlich hierbei um *Cratotechus larvarum* L. gehandelt, und beziehen sich meine an bezeichneter Stelle gemachten Angaben daher auf letztere Gattung und Art. Über das Vorkommen des *Monodontomerus dentipes* Boh. in Nonnenpuppen siehe bei Fr. Ruschka, Über erzogene Chalcididen, usw. (Verh. d. k. k. zool.-bot. Ges. in Wien. Bd. 62. 1912. p. 239).

Nachdruck verboten.

Über Regenerationsvorgänge nach Hagelschlagwunden an Holzgewächsen.

Von Dr. Ernst Voges.

Mit 11 Textfiguren.

Einleitung.

Die vernarbten Wunden an Früchten.

Hagelschlagwunden an Apfel- und Birnzweigen.

Der Wundheilungsprozeß in seiner Schutzmittelbildung.

Absterben der verletzten Gewebepartien.

Metakutisierung und Wundgummibildung im Holzkörper.

Der Rindenkörper des Callus.

Parenchym und Sklerenchym in der regenerierten Rinde.

Isolierte Bastfaserbündel und Holzkörper im Rindengewebe des Callus.

Der Holzkörper und die Markstrahlen im Callus.

Hagelschlagwunden an *Rubus Idaeus* und anderen Holzgewächsen.

Verwachsung der regenerierten Gewebekörper miteinander.

Vergleichende Zusammenfassung der Hauptergebnisse.

Einleitung.

Am 22. Juli 1910 richtete ein schweres Hagelwetter aus Nordwesten an den Garten- und Feldfrüchten im Leinetal gar arge Verwüstungen an. Je nach der Dicke der Eiskörner, die meist Feldbohnengröße hatten, sowie der Dichte und Wucht, womit sie strichweise herniedergingen, waren die Verletzungen an den Pflanzen ungleich schwer. Die Obstfrüchte wurden stellenweise so erheblich zerschlagen und erhielten so klaffende, tiefe Wunden, daß sie verkrüppelten bei dem Heilungsprozeß und für den Genuß wertlos waren. An anderen heilten die offenen Hagelschlagwunden durch die Bildung eines Wundkorkgewebes wieder aus. An den Zweigen der Holzgewächse, wie Apfel- und Birnbäumen, Himbeer, Pirus, Syringe, Spiräen, Rosen usw. hatte der Hagelschlag ebenfalls ungleich erhebliche Wunden hinterlassen, welche überaus zahlreich und in dichter Lage nebeneinander die nordwestwärts gekehrten Zweigseiten bedeckten, entsprechend der Richtung, aus welcher das Hagelwetter gekommen war. Sechs Monate nach dem Unwetter wurden die vernarbten Wunden an Früchten und Zweigen untersucht, die überaus interessante anatomische und histologische Regenerationerscheinungen aufwiesen.

Die vernarbten Wunden an Früchten.

An Äpfeln traten die Hagelschlagstellen in der Gestalt von meist drei bis acht Millimeter im Durchmesser haltenden runden, lederartigen, braunen Flecken auf, die sich scharf von der gesunden Fruchtschale absetzten. Sie waren entweder heil, oder es ging durch den Hagelfleck ein klaffender Riß. Im ersteren Falle war das Hagelkorn auf die derbe Fruchtschale aufgeschlagen, ohne sie weiter zu verletzen, während das weiche und saftreiche Zellgewebe des Fruchtfleisches von dem Anprall des Eisstücks zerquetscht ward und abstarb. In dem anderen Falle wurde die Fruchtschale durch den Hagelschlag zerschlagen, welche Verletzung sich späterhin bei der Wundheilung zu einem klaffenden Riß in der runden Schlagstelle gestaltete. Dann wieder kamen schwerere Verletzungen vor, als tiefe in das Fruchtfleisch eingedrungene eckige Löcher und Gruben, deren Außenwandungen eine braune, von den abgestorbenen Gewebspartien herrührende krümelige Oberfläche besaßen. Ob nun äußerlich verletzt, oder ob unversehrt: die Fruchthaut, die als Decke

über das abgestorbene Fruchtfleisch im Bereiche der Schlagstelle hinstrich, wies allemal ein abgestorbenes, derbes epidermales Zellgewebe auf. Ein senkrechter Schnitt durch einen Hagelfleck zeigte sodann, daß sich die tote Gewebepartie kegelförmig mehrere Millimeter tief in das Fruchtfleisch erstreckte.

Soweit das makroskopische Bild der Hagelschlagwunde der Obstfrucht sechs Monate nach der Verwundung. Die mikroskopische Untersuchung der Schnitte durch den Hagelfleck lehrte alsdann, daß in dessen Bereich eine ausgedehnte Verkorkung sowie Verholzung der Zellwände der Fruchtfleischzellen neben besonderen Korkzonenbildungen vor sich gegangen war, wie die bekannten Sudan- und Chlorzinkjodreaktionen dartaten. Sowohl die unmittelbar unter der Epidermis gelegenen chlorophyllhaltigen Zellen, welche, collenchymatischen Charakters und den Collenchymzellen der Zweigrinde entsprechend, eine Zone von vier bis fünf Zellschichten bilden, wie die großen, stärkeführenden Zellen, welche den Hauptbestandteil des Fruchtfleisches ausmachen, waren hierbei beteiligt. Wo die Fruchtschale Rißstellen aufwies, die bis über die Epidermiszellschicht hinausgingen, da hatte sich unterhalb der schalenartig eingeschrumpften, abgestorbenen Zellen eine Schicht halbmondförmiger Korkzellen gebildet, worunter Phellogenzellen erschienen, die aus den collenchymatischen Fruchtfleischzellen hervorgegangen waren.

Wo die Verletzung tiefer war, da hatten die großen Fruchtfleischzellen die Wundkorkbildung übernommen. Und zwar in der Weise, daß sich jene tangential und radial teilten, wodurch die große Zelle in mehrere kleinere zerlegt ward. Das war besonders der Fall, wo bei der Hagelschlagwunde das gesunde Fruchtfleisch sich durch eine mehrschichtige Korkzone von dem abgestorbenen abgrenzte. Diese Zone verlief ohne Unterbrechung, im senkrechten Durchschnitt als Halbkreis, vom Oberhautgewebe gegen das Innere der Frucht. Durch die Teilungen entstand ein Zellengewebe aus ungefähr isodiametrischen, unregelmäßig polyedrischen, an den Kanten mehr oder weniger abgerundeten Zellen, die nach der Wundfläche hin in tafelförmige, radial angeordnete, in der vordersten Schicht uhrglasförmige Korkzellen übergingen. Die stark verdickten Wandungen der Zellen waren verbogen.

Die Hagelschlagwunde der Birnfrucht gleicht derjenigen des Apfels. Aber es tritt in ihr ein neues histologisches Element auf: die Sklerenchymzelle. Sie spielt in dem Wundheilungsprozeß neben der Korkzelle eine wichtige Rolle. Schon mit bloßem Auge können wir an dem senkrechten Durchschnitt durch die Wunde erkennen, wie ein halbkreisförmiger, millimeterbreiter Ring im Birnfruchtfleisch sich gegen das abgestorbene Wundgewebe absetzt. Das ist eine aus Sklerenchymzellen bestehende Gewebszone, die sich zwischen das abgestorbene und das unverletzte Fruchtfleisch schiebt. Ebenso bildete sie im Bereiche der Hagelschlagstelle unterhalb der Epidermis im Fruchtfleische unregelmäßig gestaltete Nester, die, nur durch schmale Parenchymzellbrücken voneinander getrennt, ebenfalls eine Sklerenchymscheidewand abgaben. Wie denn auch in der unverletzten Birnfrucht, zumal bei edlen Sorten, so Diels Butterbirne und Holzfarbige Butterbirne, wenn sie unter einer unzureichenden Ernährung leiden, ein Ring von Sklerenchymzellnestern in dem an die Epidermis anschließenden collenchymatischen Zellgewebsgürtel liegt. Man kann diesen Ring von Sklerenchymzellnestern in jener Gewebszone der Birnfrucht ver-

gleichen mit dem Ring der Bastbündel im Rindengewebe. Wo die Steinzellen auftreten, da sind in ihrer Nachbarschaft die sonst polyedrischen Fruchtfleischzellen langgestreckt gegen das Steinzellenmosaik und in weiterer Ausbildung radiär angeordnet. Man erkennt hier auch an den Übergangsbildungen, wie die Sklerenchymzelle direkt aus der Fruchtfleischzelle hervorgeht.

Was aber besonders interessant bei dieser Gewebsbildung und Zellenmetamorphose erscheint, das ist die Tatsache, daß sie in eine unmittelbare Verbindung und Beziehung mit der Korkzellenbildung tritt. Wie bei der Apfelfrucht, so waren auch bei der Birnfrucht die abgestorbenen Zellpartien der Hagelwunde von den gesunden durch eine mehrschichtige Korkzellenlage abgegrenzt, die unvermittelt in den Steinzellengürtel überging. Und wie die tafelförmigen Korkzellen, so waren ebenfalls die Sklerenchymzellen radiär angeordnet und wie jene in ihren nach der Wundfläche und den Korkzellen gerichteten Partien gleichfalls tafelförmig. Weiterhin gegen das Fruchtfleischinnere ging die tafelförmige Zellengestalt in eine polyedrische oder runde über. Neben solchen Zellenradien, deren vordere, wundwärts gerichtete Zellen verkorkt waren und deren hintere Zellen nur stark verdickte und verholzte Wände hatten, ohne Steinzellencharakter, liefen Radien her mit vorderen Korkzellen, mittleren Sklerenchymzellen und hinteren Fruchtfleischzellen. Oder es erschienen radiäre Zellreihen, worin die vorderen wundwärts gelegenen Zellen verkorkt waren, worauf, nach Innen gekehrt, eine Anzahl Zellen parenchymatischen Charakters folgten, die zu den Sklerenchymzellen überführten. Dann wieder kamen Zellenreihen vor, in denen sich unmittelbar an die Korkzellen die Sklerenchymzellen anschlossen, ohne jene parenchymatischen Zwischenzellen.

Auf Zusatz von Sudan oder Chlorzinkjod traten die Schichten der Korkzellenwand hervor; deutlich hob sich die durch Chlorzinkjod gelbbraun gefärbte Suberinlamelle gegen die blau gefärbte Zelluloseschicht ab. Die Sklerenchymzellen wurden durch Chlorzinkjod zum Teil gelblich gefärbt, zum Teil blau, zumal die Innenlamellen der Zellwand.

Über Entstehung und Wachstum der Sklerenchymzellnester in dem Rindengewebe der an Lithiasis erkrankten Birnfrucht äußert sich nun P. S o r a u e r¹⁾: „Das Wachstum dieser Sklerenchympolster erfolgt durch eine Meristemschicht, die sich unterhalb der abgestorbenen Rindenlagen bildet und zunächst aussieht, als ob sie zu einer den Krankheitsherd abschließenden Tafelkorklage werden wollte, wie dies bei den Fusikladienpolstern zu beobachten ist. Dies ist jedoch nicht der Fall, sondern die Meristemlage bleibt, solange die Frucht noch grün und krautig ist, in Tätigkeit. Nach außen hin bildet sie (meist spärlich) neue dünnwandige Rindenzenellen, die allmählich der Zerstörung durch Bakterien und Mycelpilze wiederum anheimfallen, während sie auf ihrer inneren, dem Kernhause zugewandten Seite die dickwandigen Elemente der Steinpolster vermehrt.“

Es erscheint auch unterhalb der infolge des Hagelschlages abgestorbenen Zellpartie eine aus den lebenden Zellen des Fruchtfleisches hervorgegangene Meristemzone, die aber in unserem Falle eine wohlausgebildete, bei Sudanzusatz sich tiefrot färbende mehrschichtige Korkzellenlage nach außen, nach der Wundfläche hin bildet und diese auf solche Weise abschließt, während sie nach innen der Frucht Sklerenchymzellen entstehen läßt. In dem von

¹⁾ Handb. d. Pflanzenkrankh. Berlin 1909. Bd. 1. p. 173.

Sorauer beschriebenen Falle, wo bei einer lithiasiskranken Birnfrucht Oberhautzellen aufbrachen und hier ein Gewebeerfall vor sich ging und so eine offene Wunde entstand, welche durch die gekennzeichnete, mehrschichtige, aus tafelförmigen, radiär angeordneten Zellen bestehende Meristemlage abgeschlossen wurde, in diesem Falle ist es zu keiner Verkorkung der peripheren Zellen gekommen, die sonst nach der von Sorauer gegebenen Beschreibung und Zeichnung mit unseren umgewandelten Fruchtfleischzellen an der Hagelschlagwunde der Birnfrucht übereinstimmen.

Die aus dem Fruchtfleisch hervorgegangene Meristemzone zeigt also ein gleiches Verhalten wie die Kambiumzone bei den dikotylen Holzgewächsen, welche ungleiche Gewebelemente, nach außen Rinden-, nach innen Holzzellen entstehen läßt. Oder wie das Phellogen, das nach außen Korkzellen, nach innen Phelodermzellen produziert. Was sie äußerlich gemeinsam haben, das ist die tafelförmige Gestalt und radiäre Anordnung ihrer Zellen neben dem Vermögen, ungleiche Gewebelemente nach auswärts und nach inwärts entstehen zu lassen.

Wir haben es in den obigen Fällen mit Meristemen zu tun, die, wie Bertrand und Vöchting¹⁾ das als „Loi des surface libres“ oder als Regel aussprechen, allemal unter Wundflächen erzeugt werden. Jede freie Oberfläche hat die Bildung einer „Zone génératrice“ zur Folge. Wie Vöchting²⁾ ausführt, bilden sich bei Verwundungen der Kohlrabiknollen neben dünnwandigen Zellen ebenfalls Sklerenchymzellen, die er als Phelodermzellen anspricht, die einzeln oder in radialen Reihen auftreten können. Hiernach erscheinen also auch nach Verwundungen an Kohlrabi die gleichen Gewebelemente in der gleichen Anordnung wie nach Verletzungen an der Birnfrucht. Und später werden wir sehen, in welcher Weise sie bei Verwundungen im Rindengewebe auftreten. Was die verschiedenen Zellumbildungen nach Wundreizen ferner erkennen lassen, das ist die Tatsache, daß eine Spezifität der Zellen nicht existiert. Hierunter versteht man bekanntlich, daß „die durch die Differenzierung spezifisch gewordenen Zellen nur die gleichen Gewebelemente erzeugen können wie im Organismenreiche die Arten nur ihresgleichen“. Gegen diese Lehre, die besonders von O. Hertwig³⁾ bekämpft wird, machte Vöchting mit Recht geltend, daß sie für die Zellen des Pflanzenkörpers bestimmt nicht gilt, was ja auch das vorhin geschilderte Verhalten der Fruchtfleischzellen dartut, welchen die verschiedenartigsten Gewebelemente ihre Entstehung verdanken.

Hagelschlagwunden an Apfel- und Birnzweigen.

Die Hagelschlagwunden an den Zweigen waren in ganz ungleicher Größe und Stärke vorhanden. An den dünnen Zweigspitzen, welche dem Hagelkorn nur eine kleine Anprallfläche boten, naturgemäß unbedeutender, als an den dickeren Zweigen. So sah man denn Wunden von Linsenkorngröße, die vollständig vernarbt waren, und Wunden, ganz oder teilweise vernarbt, von mehreren Zentimeter Länge und Breite. So bei einjährigen Zweigen von 4 cm Länge und 1½ cm Breite. Was sie — und dies dürfte charakteristisch sein für die ausgeheilte Hagelschlagwunde — auszeichnete, das war der Umstand, daß zumal bei den größeren Wunden schmale Bänder des

¹⁾ Untersuchungen zur experimentellen Anatomie und Pathologie des Pflanzenkörpers. Tübingen 1908.

²⁾ a. a. O. p. 69.

³⁾ Allgemeine Biologie. Jena 1912. S. 523.

ursprünglichen und nach der Verletzung abgestorbenen Rindengewebes wie Fäden von dem oberen nach dem unteren Wundrande in der Längsrichtung der vernarbten Wunde verliefen und sie überdeckten. Die Hagelwunden waren stets ellipsenförmig, was sich daraus erklärt, daß die Rinde bei dem Hagelschlag in der Längsrichtung, parallel zur Zweigachse, platzte und später die Seitenränder der Wunde in ihrem mittleren Teile, der Region des geringsten Widerstandes, am stärksten auseinanderwichen. Während die normale Rinde glatt und straff ist, erscheint die regenerierte Rinde runzelig-
 rau und rissig, oft in Gestalt von Höckern, Krümeln und Schwielen sowie blasigen Auftreibungen, also in den verschiedensten Oberflächenbildungen.

Weniger charakteristisch, als dies makroskopische Bild der Hagelschlagwunde ist dessen mikroskopisches, wie es in seinen anatomischen und histologischen Zügen uns an Querschnitten und tangentialen und radialen Längsschnitten entgegentritt. Es stimmt nach seinem Verhalten im wesentlichen mit dem durch andere Ursachen an dem Achsenorgan hervorgerufenen Wunden überein. Der Querschnitt gibt zunächst eine Topographie der vernarbten Hagelschlagwunde. Wir erkennen schon bei Lupenvergrößerung, wie die verletzte, anormale Hälfte des Achsenorgans gegenüber der unverletzten,

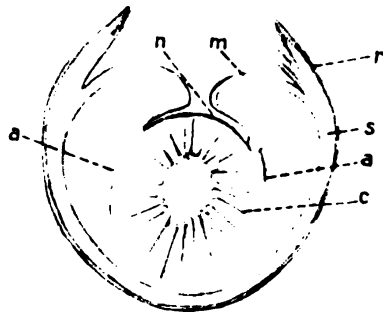


Fig. 1. Querschnitt durch die unvollständig vernarbte Hagelwunde an einem einjährigen Apfelzweige. Lupenvergrößerung. n durch die Verwundung bloßgelegter Holzkörper. m Überwallungswülste. r zersetzte, abgestorbene Rinde. s lebender Rindenkörper. a gelbe Rißlinie im Holzkörper. c abgelenkte Markstrahlen.

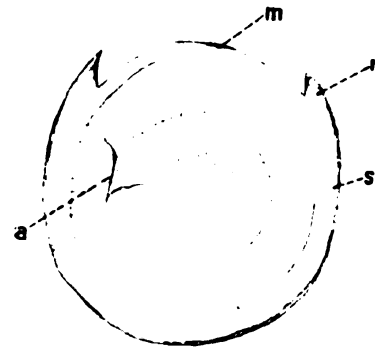


Fig. 2. Querschnitt durch die unvollständig vernarbte Hagelschlagwunde an einem einjährigen Apfelzweige. Lupenvergrößerung. m regenerierte Rinde. r abgestorbener Rindenteil. s lebende alte Rinde. a gelbe Rißlinie im Holzkörper.

normalen eine vollständige Verschiebung der Gewebepartien aufweist. Es lassen sich, wenn man will, an der typischen Hagelschlagwunde im Querschnitt drei Regionen unterscheiden, von der Peripherie nach dem Zentrum vorgehend. Die äußerste wird gebildet aus den vom Hagelkorn zerschlagenen und abgestorbenen Rindenpartien, die sich beiderseits von den Wundrändern flügelartig in Fetzen abheben. Die zweite besteht aus den Kallus- oder Überwallungswülsten, die als Gewebsneubildungen unter jenen jederseits gegen die Mittellinie hin polsterartig hervorquellen. Die dritte und tiefstgelegene Region wird ausgemacht von dem in der Mittellinie der Wunde bloßgelegten Teil des ursprünglichen Holzkörpers, bis zu welchem nach dem Absterben der Rinde die Verletzung ging und welcher Teil jederseits von den Kalluspolstern überwält wurde bis auf einen schmalen, freiliegenden Streifen, der eine braune Färbung hatte (Fig. 1). Indem sich die aus der Tiefe jederseits hervorwachsenden Kalli in der Mittellinie des verletzten Achsenorgans nicht trafen und die Wunde nicht vollständig schlossen, verblieb dort eine

schmale Rinne. Waren die Verletzungen leichter Natur, beschränkten sie sich etwa auf den Rindenteil, so war die Wunde vollständig vernarbt (Fig. 2). Nur Reste der abgestorbenen Rinde traten als wulstige Wundränder und Grenzen des neuen Periderms frei über der Rindenoberfläche hervor. Weiter erkennen wir dann bei Lupenvergrößerung auf dem Querschnitt durch das verletzte einjährige Achsenorgan, daß sich im Holzkörper auf der Grenze der Neubildungen eine braune unregelmäßig verlaufende Linie abhebt. Solche Gewebsbräunungen im inneren Achsenteile traten gerade bei Hagelwunden in verschiedener Gestalt auf, womit wir uns weiterhin noch zu beschäftigen haben. Schon P. Soraue¹⁾ bemerkt hierüber, daß man unter den Hagelstellen bisweilen in dem Radius der Wundstelle die Markkrone gebräunt, namentlich aber den Spiralteil des Gefäßbündels stark verfärbt findet. Da das zwischen der Wundstelle und der Markkrone liegende Holz des Gefäßbündels gesund sei, so bleibe nur der Schluß, daß (vielleicht durch die Markstrahlen) eine Fortpflanzung der Störung nach dem Marke hin erfolgte. — An tangentialen Längsschnitten durch die Hagelwunde erkennt man übrigens, daß sich eine Gewebsbräunung auch über den Bezirk der Hagelwunde in die unverletzte Nachbarschaft erstreckt. Und das Rindengewebe ist hier stark gelockert, was Soraue ebenfalls schon angibt.

Ob nun, wie in unserem Falle, eine Hagelschlag-, also eine Quetschwunde oder ob Schäl- und Schröpfungswunde oder eine Wunde irgendwelcher Entstehungsart: der Wundheilungsprozeß verläuft stets in ähnlicher Weise. Und zwar zerfällt er in zwei verschiedene Vorgänge: in einen Schutzmittelbildungsprozeß durch Gewebsumbildungen und in einen Regenerationsprozeß durch Gewebsneubildungen. Der erstere beginnt sofort nach der Verwundung und dem Absterben der verletzten Gewebspartien. Er gliedert sich in die schon oft beschriebenen Vorgänge der Zellwandverdickung und Verkorkung oder Metakutisierung, in Wundgummi- und Wundkorkbildung. Alles Vorgänge und -Bildungen, welche bekanntlich darauf hinauslaufen, den verwundeten Organismus gegen die schädigenden Einflüsse der Außenwelt zu schützen. Eine Abwehr zu treffen vor allem gegen verhängnisvolle Witterungseinwirkungen und gegen parasitäre Angriffe. Zu dem Zwecke erfahren die bloßgelegten Angriffsflächen des Pflanzenkörpers zunächst eine wehrhafte Umbildung in physikalischer und biochemischer Hinsicht. Der Regenerationsprozeß als zweiter Teil des Wundheilungsprozesses ist insofern eine Fortsetzung des ersten Prozesses, als er darauf hinausgeht, die Wundflächen von der Außenwelt noch vollständiger abzuschließen und die abgestorbenen und eingebüßten Körper- bzw. Gewebspartien durch Neubildungen gleichwertiger Art zu ersetzen.

Der Wundheilungsprozeß in seiner Schutzmittelbildung.

A b s t e r b e n d e r v e r l e t z t e n G e w e b s p a r t i e n .

An Querschnitten durch die neu gebildete Rinde über der Hagelwunde an Apfel- und Birnbaumzweigen erkennt man, daß ihre runzelige, krümelige Oberfläche im Gegensatz zu dem glatten normalen Periderm aus schmutziggelben, zerknüllten Fetzen abgestorbener Gewebsarten gebildet wird, die nur lose mit dem neu entstandenen Periderm zusammenhängen und im Laufe des Wachstums der neugebildeten Gewebsteile nach auswärts vorgeschoben wurden. Und so erscheinen denn auch in dieser Außenzone vormalige Bast-

¹⁾ a. a. O. p. 468.

faserbündel der alten Rinde, als ein Kennzeichen dafür, wie tief die Hagelwunde in dem Rindengewebe ging. Diese abgestorbene Gewebszone des Periderms ist die gegebene Anflug- und Siedelstätte von Pilzsporen aller Art. Vornehmlich saprophytische Pilzformen sowie Algen fanden in den zerrissenen und zerklüfteten Gewebsfetzen eine geschützte Wohn- und Nährstätte.

Recht instruktiv tritt uns das Verhalten der tödlich verletzten Gewebsregion an den Querschnitten da entgegen, wo sie bei nicht vollständig überwallten Wunden bloß zutage liegt. An dem freien Wundrande haben die Gewebelemente, als Fasertracheiden, Holzparenchymzellen, Gefäße, Markstrahlzellen eine starke Deformation erfahren. In Wellenlinien verlaufen die faserigen, geschichteten und verdickten Membranen jener Gewebelemente, welche den äußeren Wundrand bilden. Somit geben diese zerknüllten, verbogenen und zerknitterten Wandungen hier den eigentlichen Wundabschluß ab. Will man anders nicht die braunen, krümeligen Reste der abgestorbenen Gewebe, die stellenweise auf der Wundfläche vorkommen, überdeckt von den Überwallungswülsten, noch mit hinzurechnen. Die Gefäße des freien Wundrandes sind zumeist inhaltsleer.

Metakutisierung und Wundgummibildung im Holzkörper.

Im Bereich der äußeren Wundrandzone ist in weitem Umfange an den lebenden Holzgewebelementen eine Metakutisierung erfolgt. Und zwar wies nach der Sudanfärbung die innere Wandung der Zellmembran der Holzparenchymzellen und der Markstrahlzellen die Suberinlamellenbildung auf. Die innere Zellwandung vieler Fasertracheiden des bloßgelegten Holzkörpers der Hagelschlagwunde war in gewellten Lamellen abgehoben und gekräuselt oder es hatten sich konzentrische Ringe gebildet, während der äußere und größere Teil der stark verdickten Zellwand die normale Struktur besaß.

Höchst auffällig war sodann die reiche Wundgummibildung in der Gewebszone der äußeren Wundfläche, was sich durch die starke Bräunung schon dem bloßen Auge zu erkennen gibt. Dabei sind die Wundflächen des Holzkörpers, die vollständig frei liegen, gebräunter, als die von den Überwallungswülsten bedeckten, was zweifellos mit der Einwirkung der Atmosphärien zusammenhängt. Das Wundgummi, worüber ja zahlreiche Untersuchungen vorliegen, findet sich vornehmlich in den Gefäßen in solchen Mengen, daß diese vollständig verstopft sind. Während die unmittelbar an den Wundrand stoßenden Gefäße größtenteils kein Wundgummi enthalten, was mit den Verletzungen der Gewebelemente in dieser Außenzone wohl zusammenhängt, sind die weiter folgenden Gefäße bis auf mehrere Millimeter inwärts davon angefüllt. Das Sekret tritt in ungleicher Farbe, hellgelb bis dunkel, braun, und ungleicher Konsistenz, fein granuliert oder gleichmäßig harzig zähe auf. Aber nicht nur die Gefäße zeigen sich streckenlang von diesem Abscheidungsprodukt angefüllt, sondern auch die engen Lumina der Fasertracheiden sowie der allerdings nur spärlich vorhandenen Holzparenchymzellen und der Markstrahlzellen weisen das Wundgummi auf. In letzteren erscheint es meist in der Form von glänzend gelbbraunen Kügelchen. Die Markstrahlzellen sind bis auf fünf und mehr Zellen nach der Markkrone hin braungefärbt. Ein Beweis, daß gerade sie am empfindlichsten auf den Wundreiz reagierten. Wir werden hernach noch sehen, daß überhaupt die langgestreckten Markstrahlzellen die vitalsten Zellelemente im Pflanzenkörper

sind, wie auch von einer proteusartigen Natur. Es macht übrigens den Eindruck, als würde das harzige Zellausscheidungsprodukt nach der Verwundung in solchen Mengen produziert, daß die äußere Wundfläche davon ganz durchtränkt wird, wie solches die gelbe Färbung ihrer äußersten zerfaserten Gewebselemente anzeigt.

Über die Herkunft des Wundgummis in den Gefäßen und Libriformfasern bestehen nun insofern Kontroversen, als A. Will es auf eine umständliche und seltsame Art an dem Orte seines Vorkommens entstehen läßt, während nach der älteren Ansicht die parenchymatischen Gewebsteile des Holzkörpers die Bildungsstätten des Sekrets sind, das in leicht diffundierbarem Zustande in die benachbarten Gefäße und Tracheiden übergehe, um sich hier anzusammeln und eine dichtere Konsistenz anzunehmen. Wie F. Herse¹⁾ bemerkt, findet dieser Vorgang besonders an den Schließhäuten der Tüpfel statt. — Solche Bilder, wo an den Gefäßwandungen gegenüber den Membrantüpfeln der Holzparenchym- und der Markstrahlzellen helle Gummitropfen liegen, habe ich ebenfalls im Holzkörper der Hagelwunde angetroffen. Aber wie F. Herse meint, würden bei einer stärkeren Gummisekretion, wie dies bei den Hagelwunden in unserem Falle zutrifft, sich die Durchlaßstraßen zu den großen und mit Wundgummi reich angefüllten Gefäßen nicht auf die Tüpfelschließhäute beschränken.

Wie diese Exkretion sich tatsächlich vollzieht, das bleibt weiteren Unternehmungen vorbehalten. Die Exosmose-Vorgänge bei den Zellen sind bekanntlich noch vielfach dunkel. Die weitere Angabe Herses, daß das Wundgummi in den Markstrahlzellen und Holzparenchymzellen nach Behandlung mit Eau Javelle nach 1—2 Stunden verschwunden sei, während es in den Gefäßen weit länger verbleibt, kann ich insofern bestätigen, als in den tangentialen Längsschnitten durch die Hagelwunde an einjährigen Apfelzweigen die fraglichen Zellen nach einigen Stunden ihren vorhin tiefbraunen körnigen Inhalt größtenteils eingebüßt hatten, während er in den Gefäßen blasser geworden war, aber nach 24 Stunden noch nicht verschwunden.

Als Krankheitserscheinung kann man die Wundgummibildung, wodurch neben der Metakutisierung ein resistenter Wundabschluß hergestellt wird, doch wohl nicht auffassen, wie dies Prillieux getan, der von einer „Gommose bacillaire“ bei dem Weinstock spricht, wogegen sich E. Rathay wandte, der die Gummisekretion in vollständig gesunden Weinstöcken beschrieb, wozu P. Soraue²⁾ bemerkt, daß dieser Fall gelten könne als Typus für viele andere Fälle der Gummibildung als Folge des Wundreizes, der zugleich zeige, wie leicht Krankheiten als absolut parasitär hingestellt würden, bei denen es sich nur um die nachträgliche Ansiedlung von Wundbewohnern handele.

Der Rindenkörper des Callus.

Gegenüber dem normalen Rindenteil des Zweiges ist im Calluskörper der Hagelwunde die Differenzierung der Gewebe nicht streng durchgeführt. Und das weder in der Lagerung der verschiedenen Gewebearten zu einander, noch in der histologischen Ausbildung der Zellelemente, die mehr einen gleichartig parenchymatischen Charakter haben. Man spricht dann von Unregel-

¹⁾ Beiträge zur Kenntnis der histologischen Erscheinungen bei der Veredlung der Obstbäume. (Landwirtschaftl. Jahrb. 1908. p. 80.)

²⁾ Handb. d. Pflanzenkrankh. Berlin 1909. Bd. 1. p. 844.

mäßigkeiten und Störungen in den Gewebesystemen. Und hierin gleichen sich Rinden- wie Holzkörper des Regenerats. Wo der Hagelschlag nur die Rinde verletzt hatte, da war alsbald ein Periderm gebildet, welches dem normalen im wesentlichen glich. Es schloß die Wundfläche ab, deren Außenzone aus dem abgestorbenen, zerknüllten ursprünglichen Rindengewebe bestand, das gleich einem verzerrten Gitterwerk über dem neuen Oberhautgewebe lag.

Über die Entstehung des normalen Periderms bei *Pirus malus* äußert sich F. Kuhl¹⁾: „In der Epidermis werden in dem ersten Jahre drei Wände gebildet, nach Sancio in zentripetaler Folge, so daß also eine Phellodermzelle nicht gebildet würde. Nach meiner (Kuhl) Beobachtung findet nun eine rein zentripetale Teilung im ersten Jahre allerdings statt, so zwar, daß nicht die innersten der so entstandenen Tochterzellen zum Phellogen wird, vielmehr die zweite von innen ab gerechnet. Die innerste ist daher als Phelloderm anzusehen. Sancio verneint zwar die Existenz von Korkrinde, indessen zeigt die Jodschwefelsäurereaktion deutlich in jeder Zellreihe zwei innere Zellen, deren Wände blaufärbt sind. Im zweiten Jahre treten zuweilen neue Radialwände auf, deren beschränktes Vorkommen der beste Beweis für die Existenz von Phelloderm ist, insofern, als sie bis zur innersten Zelle gehen, diese selbst aber nicht teilen, ebenso wie die beiden äußeren Peridermzellen die Radialwand nicht besitzen.“

Die Angaben Kuhls kann ich soweit bestätigen. Die Epidermiszellen der jungen Achsenorgane von *Pirus malus* wie *P. communis*, die ich im Mai und Juni untersuchte, wiesen in der Regel zwei, oft auch drei nacheinander zentripetal entstandene tangential Scheidewände auf. So entstanden drei bzw. vier hintereinander in radiärer Richtung gelegene Zellen. Die äußerste wie die innerste war halbmondförmig, die mittlere tafelförmig. Die äußere Teilzelle, die am 3. Juni bereits eine Suberinlamelle gebildet hatte, gab die erste Korkzelle ab, die mittlere die Phellogen- und die innerste die Phellodermzelle. Die eine und andere Phellogenzelle sieht man in Teilung begriffen durch tangential Scheidewände. Daneben kommen auch vereinzelt radiale Teilungen vor, so daß aus der ursprünglichen tafelförmigen Phellogenzelle zwei viereckige Phellogenzellen entstehen. Eine solche radiale Teilung erstreckt sich alsdann auch auf die unter ihr liegenden Phellodermzelle, während die äußere der drei Zellen ungeteilt bleibt. In einem Falle sah ich auch, daß von den drei aus der Epidermiszelle als Initialzelle hervorgegangenen Zellen die äußerste durch eine radiale Teilung in zwei Zellen zerfallen war, während die mittlere, die Phellogenzelle, eine tangential Scheidewand aufwies und die innerste dritte oder die Phellodermzelle ungeteilt war. Der Pflanzenorganismus hält sich also nicht streng an typische Wachstums- und Teilungsschemen, sondern es kommen auch Abweichungen in mehrfachen Variationen vor.

Das regenerierte, nach der Verwundung alsbald gebildete Periderm schließt sich unmittelbar an das ursprüngliche zerknüllte und zerfetzte Periderm an, so daß streckenweise 4—6 Korkgewebsschichten zu unterscheiden sind. Das Phellogen ist ein- und stellenweise zweireihig. Die Zellen sind schmal tafelförmig mit blassem Zellinhalt. Im Peridermgewebe des Überwallungswulstes läßt sich nicht bestimmt entscheiden, welche Zellen nun

¹⁾ Über Entstehung und Verbreitung des Phelloderms. (Bot. Centralbl. Jg. XVIII. 1897. p. 167.)

Phelloderm sind und welche nicht, da die an das Phellogen grenzenden, zu 6—9 in radiären Reihen angeordneten, nach dem Holzkörper gerichteten parenchymatischen Zellen gleichmäßig tafelförmig sind und sich voneinander nur durch ihre nach inwärts zunehmende Größe unterscheiden und allmählich in kubisch bis rundlich gestaltete Rindenparenchymzellen übergehen. Sonst war das Periderm von allen Gewebearten im Überwallungswulste am differenziertesten. Der Rindenkörper bestand aus einem gleichmäßigen Parenchymzellgewebe ohne Bastfaserbündelanlagen und der Holzkörper zum großen Teil noch aus einem Parenchymholzgewebe.

Wie in der regenerierten Epidermis nach Vöchting und nach P. Kasser¹⁾ Spaltöffnungen, wenn auch nur vereinzelt vorkommen, ebenso sind in dem regenerierten Periderm Lentizellen vorhanden. Gleich den normalen erscheinen sie als ellipsenförmige über das Niveau der Rinde hervortretende Längsspalten. Ein Querschnitt durch das Organ zeigt dann, wie das gesprengte Korkgewebe mit seinen vier bis fünf auseinandergespreizten

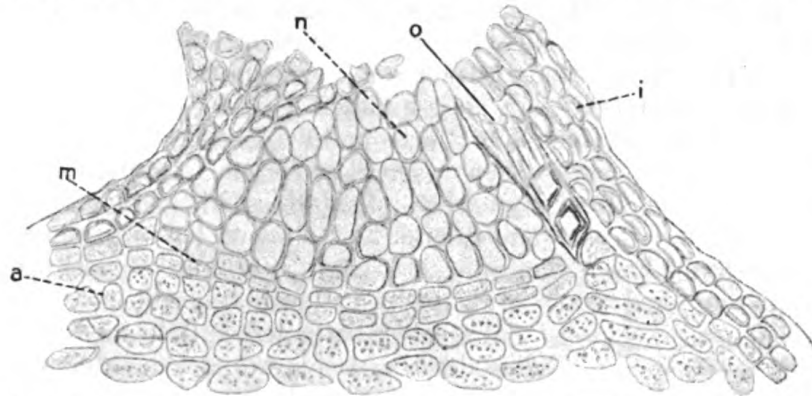


Fig. 3. Lentizelle im regenerierten Periderm der Hagelschlagwunde an einem zweijährigen Apfelzweige. Vergr. 500. a Collenchym. m Verjüngungsschicht. n Füllgewebe. o dickwandige, abnormale Korkzellen. i Periderm.

Schichten ein weitmaschiges, interzellularenreiches Füllgewebe überdeckt. Dessen Zellen sind zumeist inhaltsleer und abgestorben, länglich oder langgestreckt oder rund; die auswärts gelegenen zerknittert. Dieses Füllgewebe, das aus 8—10 Schichten bestehen kann, liegt wie ein lockeres, kahnförmiges Polster in der Rinde. Es wird gegen das Innere abgegrenzt durch die bogenförmige, 1—2-reihige und in das Phellogen des Periderms überleitende Verjüngungsschicht. Sie führt zu einer Gewebsregion über, die sich aus radiär angeordneten, würfelförmigen bis runden chlorophyllhaltigen Zellen zusammensetzt. Durch ihre radiäre Anordnung und geringere Größe unterscheiden sie sich von den echten Kollenchymzellen, von denen man einzelne an jene phellodermatische Zellenpartie grenzende in einer Längs- oder auch Querteilung begriffen sieht. Obwohl Interzellularräume das Füllgewebe durchziehen, so schließen dessen Zellen doch ziemlich dicht aneinander. Danach hätten wir mit Stahl²⁾ den einfachen Lentizellentyp vor uns, welcher an den bei *Sambucus nigra* als Lehrbeispiel vorliegenden erinnert.

¹⁾ Untersuchungen über Regeneration der Epidermis. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 20. 1910. p. 234.)

²⁾ Nach Angabe in: H a b e r l a n d t, Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig 1909. p. 433.

Im Wundperiderm fand ich die Lentizellen an größeren Hagelschlagwunden zweijähriger Apfelzweige, während sie an den Wunden einjähriger Triebe seltener auftreten. So hatte eine 3 cm lange und $2\frac{1}{2}$ cm breite vernarbte Wunde an der einen Längsseite 3 Lentizellen, die sich je in einer Reihe längs des abgestorbenen Wundrandes auf der neuen Rinde hinzogen. Weder in der Art der Lagerung, noch in der Form, noch in der Größe war ein Unterschied zwischen den Lentizellen der normalen und der regenerierten Rinde zu erkennen. Ebenso zeigten sich im Bau keine wesentlichen Abweichungen, wenssich es vorkommt, daß, wie unsere Abbildung (Fig. 3) einen solchen Fall wiedergibt, besonders große und dickwandige, in das Rindenparenchym vortretende Korkzellen als seitliche Begrenzung der Lentizelle erscheinen.

Parenchym und Sklerenchym in der regenerierten Rinde der Hagelschlagwunde.

Zu einer Zeit, wann das Periderm des Callus dem normalen gleicht, zeigt sich das parenchymatische Callusgewebe noch nicht weiter differenziert. Statt des 4—5 schichtigen Collenchymringes erscheint unterhalb des Periderms ein mehr gleichartiges Rindenparenchym, dessen Zellen tafelförmig sind, weiter inwärts rechteckig mit abgerundeten Ecken. Ihre Anordnung ist radiär, während die zur Rindenoberfläche parallel längsgestreckten, eiförmigen Collenchymzellen in ringförmigen Reihen auftreten. Insofern erinnern sie an letztere, als die Parenchymzellen ebenfalls stark verdickte Zellwände besitzen. Sodann ist, wie von anderen Seiten schon hervorgehoben, für das Rindenparenchym des Callus die gelbgrüne Färbung bezeichnend. Die Chromotophoren sind statt grün mehr gelbgrün gefärbt.



Fig. 4. Eine Gewebspartie aus dem Rindenteile des Überwallungswulstes der Hagelschlagwunde an einem einjährigen Birnzweige. Vergr. 500. m Rindenparenchymzellen. n Sklerenchymzellen. o Bastfaserzellen.

Was aber besonders auffällt im Rindenteil des Callus der Hagelschlagwunde, das sind die sklerenchymatischen Gewebselemente, welche dem normalen Rindenkörper fehlen. Ihr Vorkommen im Wundgewebe ist von Vöchting¹⁾ in der regenerierten Rinde der Kohlrabiknollen und von Simon²⁾ im Callus von Pappelstecklingen nachgewiesen. Wie beide Autoren angeben, können diese Gewebselemente, welche direkt aus den Calluszellen hervorgehen und durch die Bildung von Fortsätzen die verschiedensten Formen annehmen, einzeln oder in Gruppen im Callus auftreten.

Ich fand die Sklereiden in dem regenerierten Rindengewebe der Hagelschlagwunden am Kohlrabistengel sowie an Apfel- und Birnzweigen. Sie erschienen ebenfalls einzeln oder in Gruppen und vorzugsweise in jener Geweberegion, welche topographisch dem sekundären Rindengewebe entsprechen würde. In ihrer Umgebung hatten die parenchymatischen Calluszellen besonders stark verdickte Wände. Und es ließ sich schrittweise verfolgen, wie diese Zellen (Fig. 4) durch eine Membranverdickung, wobei der

¹⁾ Untersuchungen zur experiment. Anat. u. Pathol. d. Pflanzenk. Tübingen 1908. p. 245.

²⁾ Experiment. Untersuchungen üb. d. Differenzierungsvorgänge im Callusgewebe d. Holzgewächse. (Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. Bd. 45. 1908. p. 359.)

Zellinhalt immer mehr verschwand und das Zellumen kleiner wurde, sich direkt in typische Sklerenchymzellen umwandelten, wie sie das Wundgewebe der Birnfrucht aufwies und ferner umwandelten in typische Bastfaserzellen. Es ist nun interessant, daß sich auch im Wundgewebe der Hagelschlagwunde am Birnzweige wie in dem der Birnfrucht die Tendenz einer weitgehenden Sklerose bei den parenchymatischen Gewebselementen geltend macht, im Gegensatz zu dem Verhalten der Apfelfrucht, wo ich keine sklerenchymatischen Bildungen fand. Unsere Abbildung (Fig. 4n) gibt eine Gewebspartie aus dem Rindencallus wieder, die vorführt, wie unmittelbar neben den kleineren Bastfaserzellen eine große, mit Tüpfelkanälen versehene Sklerenchymzelle liegt, die gleich jenen aus den dickwandigen Parenchymzellen hervorging, von denen zwei in Teilung sind und andere wieder bei stark verdickten Zellwandungen und engem Lumen noch einen Zellinhalt besitzen. An der Sklerose beteiligen sich aber nicht nur die Rindenparenchymzellen des Callus der Hagelwunde, sondern auch die Markstrahlzellen im Rindenkörper des Callus. Und da gibt denn die Sklerenchymzelle in ihrer Grundform die langgestreckte Gestalt der Markstrahlzelle wieder. Man sieht Bilder, wo in der einen Zellreihe des Markstrahls eine normale Markstrahlzelle liegt und dicht daneben in der benachbarten Zellreihe des Markstrahls eine Sklerenchymzelle. Nach Strasburger¹⁾ kommt es im normalen Bastparenchym der Abietineen vor, daß Steinzellen als verdickte Elemente desselben auftreten. Nur ausnahmsweise sind es auch einzelne Markstrahlzellen, die sich so verdicken.

Bei der gekennzeichneten Zellenmetamorphose, wo sich plasmareiche Parenchymzellen in plasmaleere Sklerenchymzellen und Bastfaserzellen umwandeln, zeigt sich, daß genetisch zwischen diesen beiden Zellformen kein Unterschied ist, wenn man sonst auch wohl einen solchen macht nach ihrem ungleichen anatomischen und physiologischen Verhalten. Und weiter erkennen wir, was gerade im Regenerationsprozeß bei Gewebeverletzungen die unter normalen Verhältnissen schlummernden Potenzen der Zellen leisten können, was für Vermögen ihnen innewohnen. Es ist das ein Beleg für die Anschauung, die Strasburger²⁾ vertritt, wenn er sagt: „Es unterliegt für mich überhaupt keinem Zweifel, daß die Bastfasern durch Vermittlung der Sklerenchymzellen und der gefächerten Bastfasern, ganz ebenso von dem parenchymatischen System des Siebteils, dem Bastparenchym, resp. Cribralparenchym, abzuleiten sind, wie die Holzfasern durch ähnliche Zwischenstufen von dem parenchymatischen System des Gefäßteils, dem Holzparenchym, resp. Vasalparenchym.“

Wie am Birnzweige, so treten die sklerenchymatischen Gewebselemente auch in dem regenerierten Gewebekörper der Hagelschlagwunde am Apfelzweige auf. In dem Überwallungswulste einer solchen vernarbten Wunde, den ich zehn Monate nach der Verletzung untersuchte, war die Differenzierung der Gewebe schon so weit fortgeschritten, daß sie den normalen fast gleichkamen. Vor allem ließ sich eine Collenchymzone unterscheiden. Wie das Peridermband breiter und gleichsam fester geschnürt wurde, trat die lockere, radiäre Anordnung der Zellen, ihre nach auswärts gerichtete Streckung mehr zurück und machte einer ringförmigen, parallel zur Rindenoberfläche eingestellten Anordnung Platz. Die Reihen sind jedoch unregelmäßig und

¹⁾ Über den Bau und die Verrichtung der Leitungsbahnen in den Pflanzen. Jena 1891. p. 74.

²⁾ a. a. O. p. 248.

verschoben, aber es ist darin doch die typische Anordnung der normalen Collenchymzellen erkennbar. Diese Zellelemente der regenerierten Rinde der Wunde sind indes kleiner und gestreckter, als die normalen Collenchymzellen und an beiden Enden spitzer zulaufend, als jene, die länglich oder eiförmig sind. Die Chromotophoren, die im Rindengewebe des Callus anfänglich gelb waren, haben zum Teil eine grüne Färbung angenommen; auch eine Änderung, die zu dem Zustande des normalen Collenchyms hinüberleitet. Sodann finden wir in dem Überwallungswulste der Hagelschlagwunde nach zehn Monaten einen wohlausgebildeten Bastbündelgürtel. Und als ein Glied in dem Ringe der Bastfaserbündel treten Sklerenchymzellen auf als langgestreckte Gewebelemente mit Ausläufern in unmittelbarer Nachbarschaft der Collenchymzellen.

Angesichts der auffälligen Erscheinung, daß gerade im Wundgewebe sowie in Gallen die Sklereiden besonders reich erscheinen und daß ferner auch die Gewebelemente des Holzkörpers in der vernarbten Hagelschlagwunde an Birnzweigen eine ungewöhnliche Zellwandverdickung, also eine erhebliche Kohlehydratlamellenbildung aufweisen und es in den verletzten Birnfrüchten gar zur Bildung dicker Sklerenchymsschalen kommt, fragt man sich, wodurch eine so starke Sklerose veranlaßt wird und welche Bedeutung die Bildung jener Gewebelemente für den Pflanzenorganismus hat. Strasburger¹⁾, der den Sklerenchymzellen in der Rinde der Lärche, Fichte und Edeltanne und im Fruchtfleisch der Birne keinerlei mechanische Bedeutung zuerkennt, sowie Vöchting²⁾ sehen in der Sklerenchymzellenbildung ein Mittel des pflanzlichen Organismus, um die überschüssigen Kohlehydrate in Zellwandlamellen abzulagern, während Haberlandt³⁾ der Ansicht ist, es sei von vornherein unwahrscheinlich, daß die Pflanze ein Kohlehydrat, also einen plastischen Baustoff, als nutzloses Nebenprodukt ablagern solle. Simon⁴⁾ wieder verwirft die Ansichten beider, indem er äußert: „Eine mechanische Bedeutung kann man wohl den Sklerenchymzellen, wie dies Haberlandt ganz allgemein meint, nicht zusprechen, doch ist ebensowenig Grund vorhanden, sich Strasburgers Ansicht anzuschließen und diese Zellen als Ablagerungsstelle für überschüssige Zellulose anzusehen.“

Zweifellos hängen die ungewöhnlichen Zellwandverdickungen der Gewebelemente in dem Wundgewebe, insonderheit die reiche Sklerenchymbildung mit den abnormalen Bedingungen zusammen, unter denen sich der Regenerationsprozeß in seinen einzelnen Phasen vollzieht, wozu die gesteigerte Nährstoffzufuhr, die Art der Verarbeitung und Verwendung des Materials und als deren Ergebnis die Abweichung im Aufbau und in der Struktur der neuen, unter veränderten Lebensverhältnissen zustande gekommenen Gewebe gehören. Abnormale Wachstumsbedingungen schaffen abnormale Produkte. Und jene ergeben sich aus der zeitweiligen Offenlegung von Gewebepartien des Zweiges infolge der Hagelschlagverletzung. Vor allem ist es die veränderte Transpiration, die sich im Wundgewebe geltend macht. Und die Verdunstung kann soweit gehen, daß die bloßgelegten Gewebe ver-

¹⁾ Bau u. Verrichtung d. Leitungsbahnen in d. Pflanzen. Jena 1891. p. 77.

²⁾ Untersuchungen zur experiment. Anat. u. Pathol. d. Pflanzenkörpers. Tübingen 1908. p. 248.

³⁾ Physiolog. Pflanzenanat. Leipzig 1909. p. 195.

⁴⁾ Experiment. Untersuch. üb. d. Differenzierungsvorgänge im Callusgewebe v. Holzgewächsen. (Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. Bd. 45. 1908. p. 477.)

trocknen. Unter diesem zeitweiligen abnormal geringen Feuchtigkeitsgehalt im Rindenkörper der Hagelschlagwunde vollzieht sich denn auch, wenn nicht anders andauernde Niederschläge oder hohe Luftfeuchtigkeitsgrade herrschen, die Bildung der neuen Gewebe. Es hat nun aber Simon¹⁾ experimentell festgestellt, daß die schwächere oder stärkere Sklerenchymbildung im Callusgewebe der Pappelstecklinge von dem höheren oder geringeren Feuchtigkeitsgehalt der Luft abhing. Sein allgemeines Ergebnis können wir vielleicht auch auf die Sklerenchymbildung im Callusgewebe der Hagelschlagwunde am Apfel- und Birnzweige anwenden, indem wir ihr starkes Auftreten mit der erheblichen Verdunstung in dem Wundgewebe in Beziehung bringen, welche die Sklerenchymbildung auslöst. Wie denn auch, was Simon nach Schimper anführt, die Xerophyten „ebenfalls bei Beschleunigung der Wasserabgabe eine Zunahme des Sklerenchyms und der Gefäße zeigen“.

Wenn andererseits nun Strasburger die Sklerenchymzelle als Ablagerungsstätte überschüssiger Kohlehydrate anspricht, so gelten zwar auch die aus Kohlehydraten bestehenden „Folgelamellen“ der Parenchymzellmembranen von Embryonen als in dieser Form abgelagerte Reservestoffe, die bei der Keimung gelöst werden und zugleich dem Gewebe des Embryo eine größere mechanische Widerstandsfähigkeit verleihen²⁾. Gleichfalls werden die Hemizellulosen enthaltenden verdickten Zellwände des Leptomparenchyms mancher Holzgewächse im Winter teilweise aufgelöst nach Schellenberger³⁾. Ob indes die Sklerenchymzellen im Callusgewebe der Hagelschlagwunden an erster Stelle als Kohlehydratspeicher fungieren, das stehe dahin. Es erscheint mir ebenso wahrscheinlich, daß sie dieselbe mechanische Bedeutung in der Gewebearchitektur des Pflanzenorganismus wie die Bastfaserzellen haben.

Vielleicht kann man die Sklerenchymzelle als eine Modifikation der Bastzelle auffassen, entstanden unter abnormalen Bedingungen. Wie sie genetisch der Bastzelle gleichsteht, so würde das auch funktionell der Fall sein. Wo sie in einem Gewebeverbande erscheint, da kann sie die Bastfaserzelle vertreten. Wir sehen sie in der Gesellschaft der Bastfaserzelle als Glied des Ringes der Bastfaserbündel im regenerierten Rindenkörper der Hagelschlagwunde an den Achsenorganen unserer Pomaceen. Und genau in der gleichen Lagerung und Beziehung tritt sie, wovon man sich leicht überzeugen kann, in dem normalen Rindengewebe der Zweige verschiedener Laubgehölze, wie *Fraxinus*, *Betula*, *Carpinus* usw. auf. Eine solche Gewebszone aus Bast- und Sklerenchymzellen bezeichnet Tschirch bekanntlich als gemischten Ring.

Am sonderbarsten vollzieht sich die Sklerose in den Geweben des Fruchstiels des Apfels und der Birne. Hier erscheint nämlich im Rindenparenchym ein doppelter Bündelring sklerenchymatischer Gewebelemente. Der äußere besteht aus Bündeln großer Sklerenchymzellen von meist rundlicher oder länglicher Gestalt im Querschnitt, welche den inneren, aus typischen Bastfaserbündeln bestehenden Ring umgeben, indem sie sich dicht an diesen anlegen. Und das dem Mark des Zweiges entsprechende Fruchtsielgewebe setzt sich vollständig aus Sklerenchymzellen zusammen. Entwicklungsgeschichtlich ist nun interessant, daß zuerst der Bastfaserbündelring ge-

¹⁾ a. a. O. p. 455.

²⁾ Meyer, Arthur, Botan. Praktikum. I. Jena 1907. p. 44.

³⁾ Nach der Angabe bei Haberlandt, Physiol. Anat. Leipzig 1909. p. 597.

bildet wird und hinterher der Sklerenchymring. Und zwar geht die Bildung des letzteren, wie man das an dem Gewebekörper der jungen Fruchtsiele im Juni verfolgen kann, in der Weise vor sich, daß die Rindenparenchymzellen in der Umgebung der Bastbündel sich zu Sklerenchymzellen umwandeln. Diese Parenchymzellen sind radienartig gegen die Bastbündel gerichtet, lang gestreckt, viereckig, mit stark verdickten, tüpfelreichen Zellwänden und bedeutend größer, als die Bastzellen, an die sie unmittelbar angrenzen. Mit der Verdickung der Zellwände geht der Schwund des Zellinhaltes Hand in Hand. Die größeren der zu Sklerenchym sich umwandelnden Parenchymzellen sieht man ferner in Teilung. Im Fruchtsiel der Birne greift die Sklerose stärker Platz, als beim Apfel, und zwar schreitet sie fruchtabwärts im Stiele vor.

Isolierte Bastfaserbündel und Holzkörper im Rindengewebe des Regenerats.

Zu den Gewebesonderheiten der regenerierten Rinde gehören neben den Chromoplasten sowie den massenhaften Kalkoxalatablagerungen und den sklerenchymatischen Gewebeelementen die isolierten Bastfaserbündel und Holzkörper. Die Bastfaserbündel sind von ungleicher Größe und Gestalt, meist kreisrund. Sie sind umschlossen von 6—8 und mehr Zellenringen, deren Zellen schmal tafelförmig sind. Nach dem Bastbündel zu nehmen diese ringförmigen, meristemähnlichen Bastumwallungszellschichten an Querdurchmesser und ihre Zellelemente an Größe ab.



Fig. 5. Verkorkte Parenchymzellen im Überwallungswulste der Hagelwunde an einem einjährigen Apfelzweige. Eine Meristemzone umgibt die Parenchymzellen, die noch Plasmahalt zeigen. Vergr. 500.

Ihre Anordnung ist radiär. Neben diesem, aus dem Rindenparenchym hervorgegangenen Umwallungsmeristem mit der Korkzellenscheide des Bastbündels trifft man wohl in Umwandlung zu Sklerenchymzellen begriffene Parenchymzellen. Wenn ferner Soraue¹⁾ mitteilt, daß ähnliche Erscheinungen, wie die Umwallung der Bastbündel sich auch bei einzelnen Parenchympartien finden, welche ohne einen bisher bekannten Grund den Kern für eine ringförmige um dieselbe sich bildende Meristemzone in der Rinde abgeben und damit ebenfalls die Entstehung der Rindenknollen einleiten — so kann ich diese Angabe insofern bestätigen, als sich auch im Rindengewebe des Callus derartige Gewebsbildungen finden, welche aus mehreren Parenchymzellen bestehen, die aber in unserem Falle verkorkte Zellwandungen besitzen und ringförmig von einer Meristemschicht umgeben sind (Fig. 5). Übrigens findet man nicht nur einzelne Bastzellen, sondern auch

Bastbündel ohne Korkzellen- oder Meristemzellenumwallung. Auf radialen Längsschnitten erkennt man sodann, daß diese isolierten, dicht unter dem Callusperiderm gelegenen Bastbündelstränge schräg gegen den Holzkörper des Zweiges verlaufen.

Was schließlich die in der Rinde der Überwallungswülste der Hagelschlagwunden an Apfel- und Birnzweigen vorkommenden isolierten Holzkörper betrifft, so gilt in mehrfacher Hinsicht dasselbe von ihnen, was Soraue²⁾ von den isolierten Holzkörpern in der Rinde eines einjährigen ge-

¹⁾ a. a. O. p. 857.

²⁾ a. a. O. p. 858.

s u n d e n Birnzweiges angibt¹⁾). Er deutete sie als korrelative Hyperplasien, als Gegenreaktion des Organismus auf vorhergegangene Hemmungen, wie sie u. a. auch durch Absterben einzelner Zellgruppen im Rindenkörper holziger Achsen hervorgerufen werden. — Unsere Holzkörper haben die Form eines Kreisausschnittes, die Spitze nach einwärts, die Bogenseite nach auswärts, der Rindenoberfläche zugekehrt. In ihrer histologischen Zusammensetzung weisen sie die Hauptgewebsarten der Achsenorgane auf, wie äußeren Rinden- und Holzteil mit Rindenparenchym, Cambium, Markstrahlen, Gefäßen und Holzgewebeelementen. Die im Querschnitt eiförmigen Gebilde werden von großen prosenchymatischen Calluszellen umgeben, die zu den Parenchymzellen überführen. Eine Gliederung erhält ein solcher Gewebskörper durch die Markstrahlen, die von seiner einwärts gerichteten Spitze fächerartig ausgehen. Die Markstrahlen sind einreihig, streckenweise unterbrochen und die Markstrahlzellen von den angrenzenden Holzgewebeelementen oft bis zum Verschwinden zusammengedrückt. Seiner Hauptmasse nach besteht das hyperplastische Gebilde aus Holzgewebeelementen, welche in unserem Querschnitt den Fasertracheiden gleichen, soweit sich das überhaupt an der Tüpfelung erkennen ließ. Nur vereinzelt tauchen in dem Holzfasermosaik Gefäße und Holzparenchymzellen auf. Eine besondere Meristemschicht streicht sodann im oberen Drittel des Gewebskörpers quer und parallel mit der Wulstoberfläche durch jenen und bildet eine scharfe Grenze zwischen dessen Rinden- und Holzgewebeelementen. Die Rindenparenchymzellen sind viereckig, weiter nach auswärts tafelförmig, gradweise im Längsdurchmesser zunehmend und mit stark verdickten Wandungen. Jenes Verhalten nehmen auch die Markstrahlzellen an, sowie sie aus dem Holzteil in den Rindenteil treten und sich dort verbreitern.

Übrigens zeigen die isolierten Holzkörper in der Rinde des Überwallungs-

¹⁾ Das Vorkommen isolierter Holzkörper in gesunden einjährigen Birnzweigen scheint gerade nicht selten zu sein. Ich fand in einem besonders kräftigen Zweige eines 15jährigen, durch üppiges Wachstum und reiche Holzbildung sich auszeichnenden Birnbaumes in der Rinde an mehreren Stellen isolierte Holzknollen, die in den verschiedenen Querschnitten sowohl eine normale, wie maserige Holzstruktur besaßen. Sie zeigten einen abweichenden und regelmäßigeren histologischen Bau, als ihn S o r a u e r beschreibt und in seiner Abbildung wiedergibt. Holz- und Rindenkörper der im Querschnitt eiförmigen Knollen heben sich scharf voneinander ab. Eine wohl ausgebildete Kambiumzone schied den Rinden- vom Holzteil, der rings von ihr umzogen war. Der Holzkörper bestand in seinem zentralen, dem Mark des normalen Achsenorgans entsprechenden Teile aus dickwandigen, polyedrischen Zellen von Markstrahlzellgewebecharakter. Die Zellen ließen eine radiäre Anordnung erkennen. Aus diesem zentralen Parenchymzellgewebe entsprangen die ein- und mehrreihigen Markstrahlen, die als Radien nach dem Rindenkörper der Knolle verliefen und deren Zellen bei dem Eintritt in jenen den Charakter von Rindenparenchymzellen annahmen. Die Markstrahlzellen waren von kubischer Gestalt und ganz ungleicher Größe. Nur vereinzelt hatten sie zahlreiche runde, große Tüpfel. Der Hauptmasse nach bestand der Holzkörper aus Fasertracheiden. Das Holzgewebe war durchsetzt von den vorhin gekennzeichneten Parenchymzellen. Insofern hatte der Holzkörper der Knolle eine ungleichartige histologische Zusammensetzung, als die nach dem Holzkörper des Zweiges gekehrte Hälfte der Knolle nur aus Holzfaser-elementen bestand, o h n e G e f ä ß e, aber mit großen kubischen Markstrahlzellen. Die rindenwärts gekehrte Hälfte hatte dahingegen zahlreiche, radiär angeordnete Gefäße und Tracheiden, die nur durch stark verdickte Wandungen voneinander getrennt waren. Der Rindenkörper bestand aus radiär angeordneten Parenchymzellen mit schwachem Chlorophyllinhalt, den auch die Markstrahlzellen aufwiesen. Als eine auffallende Erscheinung nahm es sich aus, daß der isolierte Knollenkörper rings von einer besonderen, fast geschlossenen Bastbündelscheide umgrenzt war, die hinüberleitete zu der sekundären Rinde des Achsenorgans mit ihrem Bastbündelringe.

wulstes nicht allemal den gleichen Bau. So fand ich einen weniger differenzierten Holzkörper, als den vorhin beschriebenen. Er stellte gleichsam die verkleinerte Kopie des anatomischen Bildes des Gewebekörpers des Überwallungswulstes dar, insofern als sein Holzgewebe, insonderheit sein Markstrahlgewebe ein ähnliches Verhalten zeigte. Der Holzkörper war im Querschnitt kegelförmig, die Spitze holzwärts, die Basis rindenwärts gerichtet. Auch er war von einer prosenchymatischen Callusgewebszone umrandet. Die nach einwärts gekehrte Spitze füllte eine parenchymatische Gewebspartie aus, welche im Bogen rechts und links sowie aus der Mitte mehrreihige Markstrahlstränge aussandte, aufwärts gegen die Rinde, nach der Basis des kegelförmigen Holzkörpers, wobei die Strahlen an Breite abnahmen. Sie gehen dann in das Rindengewebe des Überwallungswulstes über, das noch undifferenziert war. Die Bastbündelanlagen erschienen hier als versprengte Bastzellen im Rindenparenchym. Die Xylemfelder zwischen den Markstrahlen der Rindenknolle setzten sich aus den vorhin aufgeführten Gewebeelementen zusammen. Was sie weiter auszeichnet, das ist ihre maserige Holzstruktur. Die gleichen Unregelmäßigkeiten in der Lagerung der Holzfasern weisen die Xylemfelder zwischen den verbreiterten Markstrahlen im Wundholz der Überwallungswülste auf.

Diese histologische Übereinstimmung der isolierten Holzkörper in dem Rindenteil mit dem Wundholz des verletzten Achsenorgans deuten darauf hin, daß beide Gewebekörper unter den gleichen oder doch sehr ähnlichen Bedingungen entstanden, denen ihre Meristeme, woraus sie hervorgingen, ausgesetzt waren. Jene Übereinstimmung ist aber auch zugleich der Ausdruck einer gewissen Korrelation, die zwischen beiden herrscht. Aber worin besteht diese? Es sind die holzigen Rindenknollen in Beziehung zu den Präventivknospen gebracht¹⁾. Aber wie Krick²⁾ nachwies, entstehen die Rindenknollen der Rotbuche sowohl im Anschluß von Präventivknospen, wie selbständig in der Rinde. Wo letzteres der Fall, da haben die Knollen im Zentrum einen Holz-, Kork- oder Bastkern, aber nie echtes Mark. Unsere Rindenknollen haben nun nichts mit einer normalen Knospenanlage zu tun. Wie Gerult³⁾ und Sorauer⁴⁾ feststellten, ist die Entstehung der Knollen weder von Präventiv- noch von Adventivknospen herzuleiten. Sie sind vielmehr selbständige Gebilde, vom Holzkörper des Achsenorgans durch Cambium und sekundäres Rindenstück getrennt, was ich nur bestätigen kann. Wenn ferner Sorauer⁵⁾ bemerkt, daß Parenchympartien in der Rinde ohne einen bislang erkennbaren Grund den Kern für eine ringförmig um dieselbe sich bildende Meristemzone abgeben und damit ebenfalls die Entstehung jedoch von meist regelmäßiger gebauten Rindenknollen einleiten, so trifft das für unsern eben beschriebenen ersten Fall insofern gleichfalls zu, als die holzwärts gekehrte Spitze der eiförmigen Rindenknolle in der vernarbten Hagelschlagwunde des einjährigen Birnzweiges aus einer Parenchymzellgruppe bestand, während im zweiten Fall ein Markstrahlzellgewebe den Ausgangspunkt bildete. Allerdings kann man in beiden Fällen eigentlich nicht von einem Kern, sondern nur von einem Knollenbildungspunkt sprechen. Auch F. Herse⁶⁾ erwähnt kleiner Maserknollen im Vernarbungsgewebe,

¹⁾ Vgl. Sorauer, Handb. d. Pflanzenkrankh. Berlin. 1909. Bd. 1. p. 853 ff.

²⁾ Zitiert bei Sorauer, a. a. O. p. 854.

³⁾ Nach Sorauer, a. a. O. p. 855.

⁴⁾ Sorauer, a. a. O. p. 855.

⁵⁾ Sorauer, a. a. O. p. 857.

⁶⁾ A. a. O. p. 80.

die weder Bastfasergruppen, noch tote oder verkorkte Zellen zum Mittelpunkt hatten.

Die Maserbildung der Maserknollen ist nach A. Frank¹⁾ bedingt durch die abnorme Vergrößerung und Formänderung der Markstrahlen, welche die Kerne der Knollen abgeben. „Um sie herum laufen die aus Gefäßen, Holz- zellen und gewöhnlichen kleinen Markstrahlen bestehenden Holzstränge.“ Wenn indes Frank meint, das Maserbild biete sich nur von der Ober- fläche oder im tangentialen Längsschnitt dar, so trifft das weder für unsere holzigen Rindenknollen, noch für das „wimmerige“ Wundholz des Achsen- organs zu. Denn auch der Querschnitt zeigt die Verlagerung der Holzgewebs- elemente. Wie nach Frank's Ansicht das Markstrahlgewebe die Wachs- tumsrichtung der Holzelemente beeinflußt, daß sie umbiegen, so sieht man andererseits aber auch, wie bereits erwähnt, im Vernarbungsgewebe, daß die Markstrahlen von den benachbarten Holzgewebselementen zusammen- gedrückt werden.

Die Entstehung der Rindenknollen selbst erklärt dann Sora uer durch außergewöhnliche reiche Ernährung der Bastscheiden, während Küster²⁾ die Ansicht äußert, daß die Bedingungen, unter denen Knollen- masern entstehen, noch nicht hinlänglich bekannt seien; der Umstand, daß sie vorzugsweise in der Nähe von überwallenden Wundflächen nach So- rauer's Angabe sich bildeten, spräche dafür, daß irgendwelche durch die Verwundung geschaffene Bedingungen die Veranlassung zu ihrer Bildung werden.

Wir lernten bisher verschiedene abnorme Gewebskörper im Vernarbug- gewebe kennen, die ihre Entstehung besonderen Meristemen verdanken. Zumeist bestehen sie aus Bastfaserpartien und aus abgestorbenen oder ver- korkten Parenchymzellen, die von einem Korkgewebe umwallt oder ein- gekapselt wurden als tote und unschädlich gemachte Fremdkörper im lebenden Organismus. Eine zweite Gruppe setzte sich zusammen aus holzigen Rinden- knollen oder Holzsträngen mit maseriger Struktur, die sich im Anschluß an Präventivknospen entwickeln oder selbständig in der Rinde und dann mit einem hier vorhandenen Gewebskern aus Parenchym-, Holz-, Kork- oder Bastelementen. Eine dritte Gruppe besteht aus isolierten holzigen Rinden- knollen ohne einen derartigen Kern.

Die isolierten Holzknollen im Vernarbungsgewebe sind nach Sora uer Reaktionsprodukte auf örtliche Hemmungsherde in dem Rindengewebe, wie sie in abgestorbenen Zellmassen oder abortierten Knospenanlagen ge- geben sind und die nun in den benachbarten Zellen zu Neubildungen an- regend wirkten.

Vielleicht ist auch die nachfolgende Erklärung erwägenswert: Wie nämlich der Organismus im Regenerationsprozeß die verschiedenartigsten Abweichungen von den normalen Bildungen zeigt in abnormalen Zellen und Geweben, wie Sklerenchymzellen erscheinen, welche das normale Rinden- gewebe nicht hat, wie Markstrahlzellen sich in Sklerenchymzellen umwandeln, wie diese beiden Zellarten sowie die Holzgewebselemente die sonderbarsten Formengestaltungen annehmen, wie Wundkorkgewebe im Holzgewebe auf- tritt, wie Holzparenchymzellen in Gemeinschaft mit Markstrahlzellen ein intermediäres Gewebe im Holzteil des Vernarbungsgewebes bilden, auf welche

¹⁾ Die Krankheiten d. Pflanzen. Breslau 1895. Bd. 1. p. 82.

²⁾ Patholog. Pflanzenanat. Jena 1903. p. 184.

pathologischen Erscheinungen wir später noch einzugehen haben, wie hier der Organismus in dem Bestreben, die durch Verwundung eingebüßten Körperteile durch Ersatzbildungen auszugleichen, sich in einem Gestaltungstrieb offenbart, der abweicht von dem herkömmlichen, unter gewöhnlichen Bedingungen auftretenden, so wird das nicht nur bei Zellen- und Gewebe-, sondern auch bei Organanlagen der Fall sein. Wir möchten deshalb unsere isolierten Rindenknollen in dem Regenerat der Hagelschlagwunden der einjährigen Birnzweige als abnormale Präventivknospenanlagen ansprechen. Sind doch unvollkommene Differenzierungsprodukte ein allgemeines Kennzeichen im Aufbau des Regenerats! Wodurch ihre abnormale Bildung herbeigeführt wurde, welches die infolge der Verwundung entstandenen, abgeänderten Wachstums- und Gestaltungsbedingungen sind, unter denen sie zustande kamen, das hat vorerst nichts mit der Deutung unserer Gebilde zu tun. Die obige Deutung schließt sich somit der Anschauung der älteren Forscher an, welche die Rindenknollen aus Knospen ableiteten.

Der Holzkörper des Überwallungswulstes.

Wer zahlreiche Schnitte durch die vernarbten Hagelschlagwunden ein- und zweijähriger Apfel- und Birnzweige durchmustert, der erkennt bald, daß das Vernarbungsgewebe nicht nach ein und demselben Schema entstand und nicht allemal das gleiche histologische Bild erscheint. Es ist vielmehr reich an Variationen. Und diese werden hervorgerufen durch die ungleich starke Verletzung und ungleichartige Wundverheilung und im Zusammenhange damit durch das Verhalten der Markstrahlen, welche dem histologischen Bilde des Vernarbungsgewebes vielfach geradezu seine charakteristischen Züge geben.

Wo durch die Hagelschlagverletzung der Holzkörper des Zweiges bloßgelegt war, da hatte der Xylemteil der von beiden Seiten des Achsenorgans gegen die Mittellinie wachsenden Überwallungswülste eine ellipsenförmige Gestalt im Querschnitt, der uns am besten einen orientierenden Überblick über die Gewebeneubildungen des verletzten Achsenorgans gewährt. Ist auch nicht stets die von de Vries¹⁾ unterschiedene Zonenfolge des primären und des sekundären Wundholzes mit je einer kurzzelligen und langzelligen Zone zu erkennen, so ist doch diese Anordnung typisch für das Wundholz des Vernarbungsgewebes. Über der gelben Reißlinie der Autoren sehen wir gewöhnlich kurzzelliges aus isodiametrischen, viereckigen, radiär angeordneten Zellen bestehendes primäres Wundholz, das zu langzelligem, von trachealen Zellelementen durchsetzten übergeht, worauf eine kurzzellige, aus parenchymatischen, viereckigen Zellen bestehende Gewebszone folgt, in der Gefäße erscheinen und die zu dem normalen Holzgewebe überleitet. Über das Verhalten der Markstrahlen lehrt uns sodann unser Querschnitt, daß sich in der Wundregion schrittweise eine zunehmende Abweichung von dem normalen Bau verfolgen läßt, und zwar von den Seiten des verletzten Achsenorgans nach der Mittellinie hin, wo die Verwundung am stärksten war. Zeigte lateralwärts der einreihige aus dem Markgewebe aufsteigende Markstrahl noch ein normales Verhalten, so traten bei dem nächsten benachbarten in einer bestimmten Höhe schon einige, zwei bis vier, Markstrahlzellen in dem Zellenzuge auf, die größer und anders gestaltet waren, als die normalen (Fig. 6, 7 u. 8).

¹⁾ Über Wundholz. (Flora. 1876.)

Nach dieser allgemeinen Schilderung eines Querschnitts des Holzkörpers im Vernarbungsgewebe der Hagelschlagwunde einjähriger Birn- bzw. Apfelzweige gehe ich zur Darstellung von Einzelbildern über. So hatte der Querschnitt durch das Vernarbungsgewebe der Hagelschlagwunde an einem dreijährigen Birnzweige siebzehn Monate nach der Verletzung im Juli das folgende histologische Aussehen: Die Überwallungswülste waren in der Mittellinie des Achsenorgans über der Holzblöße zusammengestoßen und verwachsen bis auf einen keilförmigen Längsspalt über der Holzblöße. Das Regenerat hatte an seiner freien Oberfläche ein Periderm, das auch den keilförmigen, mitten im Holzkörper des Überwallungswulstes gelegenen Spalt umgrenzte.

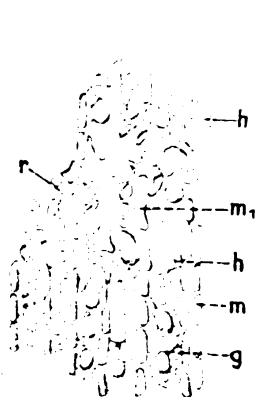


Fig. 6. Markstrahlzellgewebspartie aus der vernarbten Hagelschlagwunde eines einjährigen Birnzweiges. Querschnitt. Vergr. 150. m normaler Markstrahl. m₁ abnormaler Markstrahl. r Rißlinie. h normales Xylem. g Gefäß.



Fig. 7. Markstrahlzellgewebe. Querschnitt. Vergr. 500. m hypertrophierte Markstrahlzellen. a Holzparenchymzellen. a Rißlinie im Markstrahlzellgewebe.

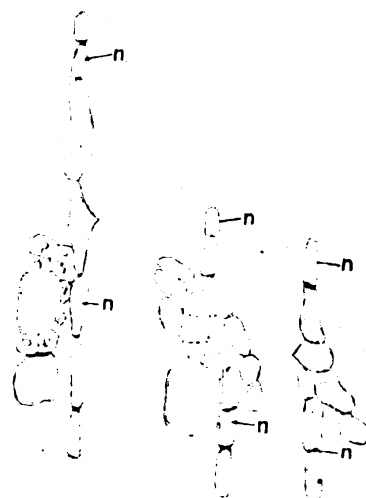


Fig. 8. Hypertrophierte Markstrahlzellen aus dem Xylem des verletzten Achsenorgans eines einjährigen Birnzweiges. Vergr. 300.

Über dem Spalte breitete sich glockenförmig, die Kuppel rindenwärts gekehrt, eine parenchymatische Wundholzgewebspartie mit radiärer Zellenanordnung aus als jüngster Teil des Callusgewebes. Aus ihm gingen durch Streckung der Zellen die nach aufwärts gegen den Rindenteil verlaufenden Markstrahlen hervor. Das Holzgewebe, schon soweit von normaler Struktur, war aber noch stark durchsetzt von den stärkereichen Parenchymholzzellen, woraus die Holzgewebelemente dieses regenerierten jüngsten Xylemteils des Überwallungswulstes hervorgegangen waren. Zu beiden Seiten der glockenförmigen Gewebspartie, also in den unteren lateralen Regionen der verwachsenen Überwallungswülste über der Holzblöße, war das histologische Querschnittsbild wieder ganz anders. Hier folgte auf die schmale Zone des kurzcelligen Parenchymholzes eine Region langzelliger und zugespitzter Gewebelemente, die in Strängen schräg aufwärts nach der Medianlinie des Überwallungswulstes zogen. Und in den Zügen dieses parenchymatischen Wundholzes erschienen, an Zahl nach dem Rindenkörper des Regenerats zunehmend, Gefäßzellen mit Hoftüpfeln und schrägem Längsspalt. Wo eine solche tracheale Zelle an eine Markstrahlzelle grenzte, war die radiale Wandung reich betüpfelt. Einzelne Gefäßzellen zeigten leiter- oder treppenförmige Verdickungen.

Die langzellige Wundholzregion leitete sodann hinüber zu einer schmalen Gewebszone, die nur aus Gefäßen und Parenchymzellen bestand, worauf das normale Xylem folgte. In dem mittleren Teile der verschmolzenen Überwallungswülste war es nach 17 Monaten noch nicht zur Bildung eines Bastbündelringes gekommen. Einzelne Bastfaserzellen und Gruppen von Sklerenchymzellen erschienen versprengt im Rindengewebe, während die lateralen Teile des Regenerats einen geschlossenen „gemischten“ Bastbündelring aufwiesen.

An den Querschnitten durch die Überwallungswülste ließ sich nun vielfach verfolgen, wie sie, im Wachstum fortschreitend, sich von den Seiten nach der Mittellinie über die Holzblöße bewegten, in gleichem Maße auch die Markstrahlen von ihrer geraden Richtung abgelenkt wurden, so daß sie unter einem spitzen Winkel jederseits in den Überwallungswulst traten. Sind sie im normalen Xylem meist ein- und zweireihig, so verbreitern sie sich enorm im Vernarbungsgewebe, welche Verbreiterung gegen die Rinde hin jedoch abnimmt. Indes treten sie doch noch mit 1 bis 4 Zellreihen im Querschnitt in den Rindenkörper des Regenerats ein.

Was sodann die Holzgewebsfelder zwischen den Markstrahlen im Bereiche der Wunde betrifft, so zeigen diese ein ungleiches Verhalten. Es kommt vor, daß ein solches Feld in seinem unteren, dem Marke zugekehrten Teile normales Holzgewebe hat, während der größere, rindenwärts gerichtete Teil des Feldes eine Verwerfung seiner Elemente zeigt, so zwar, daß sie längsgestreckt und spindelförmig auf dem Querschnitte erscheinen. An dieser Verlagerung nehmen hier auch die Zellelemente der cambialen Region teil, die langgezogen und wellenförmig verlaufen. Dann wieder sehen wir auf Tangentialschnitten, wie die Gefäße kurz und verbogen sind und die sonst langgestreckten prismatischen Holzparenchymzellen bauchig erweitert oder eingeschnürt. Die Gewebelemente sind stellenweise wie im Wirbel umeinander gedreht. Und auf radialen Längsschnitten erkennt man, wie die Fasertracheiden verbogen und die Holzparenchymzellen länglich sind mit einem faserförmigen Fortsatz. Kurz, es treten die sonderbarsten Gestaltungen unter den Holzgewebeelementen auf¹⁾. So gestaltlich ungleich auch sonst das Verhalten der Markstrahlen in den Hagelschlagwunden ist, so kehrt doch darin eine Tendenz stets wieder: das ist, wie schon erwähnt, die Neigung zu einer Strahlenvervielfachung und Verbreiterung, die bis zur Entstehung eines besonderen Gewebes geht, welches zumeist wohl durch Teilung und durch ein hypertrophisches Wachstum der Markstrahlzellen und der benachbarten Holzparenchymzellen zustande kommt. Es ist das eine besonders auffällige histologische Erscheinung, insofern als in fast gleicher Höhe alle Markstrahlen, einreihige und zweireihige, die bis dahin ein normales Verhalten zeigten, in einer bestimmten ausgedehnten Region unterhalb der Hagelschlagwunde plötzlich, wie in gleicher Reaktion auf eine äußere Reizeinwirkung, zu einem hypertrophischen Wachstum und Vermehrung ihrer Elemente übergegangen wären (Fig. 6, 7 u. 8). Hier zeigte die Markstrahlzelle noch in Gestalt, Lagerung und Größe das normale Verhalten und schon die nächste nach der Wunde hin hatte eine andere Form, Lagerung und Größe sowie veränderten Bau. Während ihre Vorgängerin nach inwärts langgestreckt, tafelförmig war, hatte ihre Nachbarin nach auswärts bei einer Größenzunahme, stärkerer Wandverdickung und Tüpfelung eine längliche bis eiförmige oder trapez-

¹⁾ Vgl. auch Mäule, C., Der Faserverlauf im Wundholz. (Bibl. bot. 1895.)

oder keilförmige, tangential gestreckte Gestalt. Die Abkömmlinge waren durch radiale und tangential Zellteilungen entstanden und deren Herkunft noch deutlich zu erkennen. Die Holzparenchymzellen dieses intermediären Markstrahlgewebes, das sich zwischen das alte, vor der Verwundung vorhandene Holzgewebe der Achse und das nach der Verletzung entstandene Gewebe schiebt, hatten meist die runde Gestalt der normalen Zellen, waren nur größer als diese.

Sodann ließen sich an solchen Markstrahlzellen eigentümliche Abweichungen verfolgen. Während die eine Zelle noch ihren Stärkekörnerinhalt besaß, war der Zellinhalt bei einer anderen in unmittelbarer Nachbarschaft auf Kosten der beträchtlich verdickten Wandung sehr reduziert und bei einer dritten gar verschwunden. Man sieht oft solche Markstrahlzellen in radiärer Anordnung, wo alsdann die eine Zelle in dieser Reihe noch ihren ursprünglichen Zellcharakter gewahrt hat. Auch die ursprüngliche Gestalt der Zelle des Markstrahlzellgewebes ist in der abnormalen verdickten noch wieder zu erkennen. War jene viereckig, mit der Längsachse parallel zur Wundfläche, so erscheint sie als verholztes Gewebelement in gleicher Lagerung und Gestalt und nur dahin verändert, daß durch den Schwund des Zellinhaltes und durch die Zellwandverdickung die Längswände gegeneinander gedrückt sind. So kommt es, daß neben einer Reihe im Querschnitt polyedrisch gestalteter normaler Holzgewebelemente eine andere Reihe verläuft, deren Zellen spindelförmig oder von länglicher zusammengedrückter Gestalt und schräger Lagerung sind.

An Pappelstecklingen bilden sich nach S i m o n¹⁾ die Calluszellen direkt zu Tracheiden um, indem sich ihre Wandungen netzartig verdicken. Also ein ähnlicher Vorgang, wie er sich an den Zellen des verbreiterten Markstrahls abspielt. Und ferner: wie sie im Wundholz durch Verholzung und Verdickung ihrer Membranen einen Holzfasercharakter annehmen, so können sich, wie früher dargelegt, im Rindenkörper des Überwallungswulstes die Markstrahlzellen zu Sklerenchymzellen umwandeln. Auch hierfür findet sich ein Analogon. Von dem Markcallus der Pappelstecklinge berichtet nämlich S i m o n²⁾, daß in dessen peripheren Schichten kleinere oder größere Sklerenchymgruppen erscheinen können, welche direkt aus den parenchymatischen Calluszellen hervorgehen.

Eine bereits eingangs erwähnte Erscheinung in dem anatomischen Bilde des Querschnitts der vernarbten Hagelschlagwunden, die s e c h s M o n a t e nach der im Juli erfolgten Verletzung untersucht wurden, besteht in einem langen bogenförmigen Riß im Holzkörper des Zweiges auf der Grenze des Jahresringes. Gleichzeitig bildete in solchen Hagelschlagwunden der in seinem mittleren Teile auseinanderklaffende Riß die untere Grenze, von wo das Markstrahlzellgewebe ausging und sich rindenwärts wandte, während auf der anderen Seite des Risses nach dem Mark hin das Holzgewebe ein normales Verhalten aufwies. Gewöhnlich ward diese gelbe Rißlinie von kleineren, unzusammenhängenden Rissen begleitet (Fig. 6 u. 7 r.). Die beiderseits aus verdickten Zellwandungen bestehenden Ränder des Risses waren gebräunt, und eine braune Masse, die Reste der von den lebenden Zellen zusammengedrückten, abgestorbenen Zellen, lag in der am weitesten klaffenden Stelle des Risses. Ebenso waren die Grenzzellen des Spaltes gebräunt und die an-

¹⁾ Experiment. Untersuch. üb. d. Differenzierungsvorgänge im Callusgewebe v. Holzgewächsen. (Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. Bd. 45. 1908. p. 359.)

²⁾ A. a. O. p. 330.

grenzenden Gefäße des normalen Holzes mit Wundgummi gefüllt. Was besonders auffiel, das war die Korkbildung in der Umgebung des dreieckig in der Mitte auseinandergewichenen Risses. Nicht nur, daß im Bereiche des Wundholzgewebes eine Verkorkung der Gewebselemente an der Reißgrenze vor sich gegangen war, sondern es hatte sich auch ein regelrechtes Korkgewebe, also mitten im Holzkörper gebildet. Aus dem Wundholzgewebe war eine Phellogenschicht hervorgegangen, welche eine die Lücke begrenzende Zone halbmondförmiger Korkzellen hatte entstehen lassen. Ob man hier übrigens von einem Markstrahlzellgewebe oder von einem Parenchymholzgewebe sprechen will, das läuft schließlich auf dasselbe hinaus, da ihre Elemente gleichartig sind.

Ein anderer Querschnitt wieder zeigte über der Reißlinie einen breiten zentralen Gewebsstrang in dem Überwallungswulste aus parenchymatischen Zellelementen, der im Bogen aufwärts gegen den Rindenteil des Wulstes stieg, während jederseits von seiner Basis mehrreihige Markstrahlen fächerartig ausgingen. Das Holzgewebe zwischen diesen Markstrahlen bestand im unteren Teile des Wundholzes unmittelbar über der braunen Linie nur aus großen Parenchymholzzellen, denen sich aber alsbald, in kurzer Entfernung von der Reißlinie, dann Gefäße zugesellten, wonach Fasertracheiden erschienen. Zu beiden Seiten des Markstrahlgewebsstranges und in der an den Rindenteil grenzenden Zone sind die Holzgewebselemente tangential gestreckt, stark verlagert. Das tracheale Gewebelement tritt in diesem Wundholz fast ganz zurück. Weiter weg von dem breiten Gewebsstrang nimmt das Wundholz sodann ein normales Verhalten an. Oder man sieht Querschnittsbilder, worin das über der Reißlinie sich ausbreitende Markstrahlzellgewebe in einen sich verjüngenden weiten zentralen Strang gegen das Cambium aufsteigt und eine schmale, nur aus vier Zellreihen bestehende Zone von Holzgewebselementen zwischen ihm und dem Cambium als Zwischenstück besteht.

Die wucherartige Entstehung des Markstrahlzellgewebes in manchen Hagelschlagwunden findet vielleicht darin ihre Erklärung, daß wenn auch nicht der Holzkörper, sondern nur der Rindenkörper des Achsenorgans direkt verletzt wurde, so doch durch den Anprall, verbunden mit der Kältewirkung des aufschlagenden Hagelstücks eine Störung im Holzgewebe hervorgerufen ward, die vor allem die Markstrahlzellen traf, welche alsdann in der Weise darauf reagierten, daß ihr aufgespeichertes plastisches Material mobil wurde. Die Markstrahlzellen verbrauchten es selbst zu einem hypertrophischen Wachstum und zu ihrer Vermehrung durch Teilung. Da der durch den Hagelschlag hervorgerufene Reizzustand kein anhaltender war, so ließ, als wäre die Störung zur Ruhe gekommen, die plötzlich eingesetzte Gewebsbildung der Markstrahlzellen allmählich nach und die normale Orientierung der Gewebe trat wieder ein durch die inzwischen begonnene Tätigkeit des Cambiums vom Wundherde her.

Welchen Anteil neben den Produkten des ursprünglichen Cambiums und denen besonderer Calluseristeme indes die Markstrahl- und die Holzparenchymzellen, soweit ihre Wandungen nicht zu sehr verholzt sind, an dem Zustandekommen des Wundholzes hatten durch Teilung ihrer Zellen und durch eigene Meristembildungen, das ließ sich in den verschiedenartigen Vernarbungsgeweben nicht im einzelnen feststellen. Daß die Markstrahlzellen und die Holzparenchymzellen zu eigenen Zell- und Gewebebildungen befähigt sind, dafür liegen auch anderweitig Belege vor. So berichtet

Sorauer¹⁾, daß in den durch Frost geschädigten Holzgewebspartien junger Eichentriebe die Heilungsvorgänge von den Markstrahlen ausgingen. „Dabei werden die im normalen Holze nur 1—2 Zellen breiten Markstrahlen ausgeweitet und unregelmäßig vielzellig und ziehen sich erst wieder zu ihrer früheren Breite zusammen, wenn das lockere Gewebe in das sekundäre Holz übergeht. Dann bildet sich auch wieder eine normale Cambiumzone aus, welche in der Zeit, in der die Markstrahlen wuchernd sich verbreiterten, unkenntlich geworden war.“ Und weiter heißt es, daß das jugendliche Holz, der Splintring, direkt in das Parenchymholz des Lockerungsgewebes übergegangen sei. Und Frank²⁾ äußert sich: Wiewohl sämtliche Cambiumzellen der Erzeugung von Callus fähig sind, so zeigen doch Treculs Untersuchungen, daß in manchen Fällen den an den Enden der Markstrahlen stehenden Zellen hierbei der größte Anteil zukommt, was auch nicht Wunder nehmen kann, da die Markstrahlen jedenfalls vorwiegend die zur Bildung des Callus bestimmten Nährstoffe zuführen. Man sieht oft die von den Markstrahlen ausgehenden Zellen des Callus reichlich vermehrt, förmliche Büschel von Schläuchen oder Zellreihen darstellen, die sich nach den Seiten hin weiter ausbreiten; daraus erklärt sich die Meinung älterer Beobachter, daß die Regeneration von den Markstrahlen allein ausgehe.“ — Ebenso fand Mäule³⁾, daß in Holzwunden bei Koniferen die jüngsten, unverholzten Elemente des Holzkörpers sich septieren und Parenchymzellen liefern. Und Tompa⁴⁾ wies nach, daß sich das Holzparenchym von *Vitis* an der Callusbildung beteiligt.

Aus dem Angeführten im Verein mit unseren obigen Ergebnissen folgt, daß bei Gewebsneubildungen in Wunden an Achsenorganen der Holzgewächse die jugendlichen, noch unverholzten Holzgewebs Elemente, insonderheit die Markstrahlzellen sich durch Teilung und oft wucherartiges Wachstum ihrer Zellen an der Callus- bzw. Wundholzbildung unter gewissen Umständen weit mehr beteiligen, als gemeinlich angenommen wird. Und es stellte sich ferner heraus, daß bei bestimmten Störungen im Gewebekörper junger Achsenorgane, wie sie durch Hagelschlag und Kälte hervorgerufen werden können, ohne daß gerade Gewebspartien im Holzkörper nachweisbar abgetötet wurden, daß da die Markstrahlzellen dennoch in einer Weise darauf reagieren, welche durch eine stärkere oder schwächere Wucherung ihrer Zellelemente zum Ausdruck kommt.

Hagelschlagwunden an *Rubus idaeus* und anderen Holzgewächsen.

Obschon im wesentlichen die anatomischen Verhältnisse der Hagelschlagwunden bei *Rubus idaeus* denen der Pomaceen gleichen, so bieten sie doch in Übereinstimmung mit dem besonderen histologischen Aufbau des Achsenorgans der Himbeere wiederum Eigenartiges. Der Gewebekörper des Himbeerstammes besteht nämlich, um dies kurz zum Verständnis der nachherigen Darstellung der pathologischen Erscheinungen zu erwähnen, aus den folgenden Gewebesystemen: auf die einschichtige Epidermis mit verhältnismäßig kleinen länglichen Zellen folgt ein 6—7 schichtiges Rindengewebe, dessen vier äußere, an die Epidermis grenzende Schichten aus länglichen Collenchymzellen bestehen, woran sich die Schichten groß-

¹⁾ A. a. O. p. 617.

²⁾ Die Krankheiten der Pflanzen. Breslau 1895. Bd. 1. p. 72.

³⁾ Zitiert bei Küster, a. a. O. p. 160.

⁴⁾ Zitiert bei Küster, a. a. O. p. 163.

lumiger Rindenparenchymzellen schließen. Daran reiht sich als eine immerhin ungewöhnlich histologische Erscheinung im Gewebekörper der Dikotyledonen ein 8—10-schichtiger Korkgewebering von fast gleicher Breite wie das primäre Rindengewebe (Fig. 10). Und zwar wechseln in diesem intermediären Korkgewebe phellogenähnliche Zellschichten oder Phelloidzellschichten, wie sie Höhnel¹⁾ genannt hat, mit den Korkzellenschichten ab, derart, daß auf die an die großzellige Rindenschicht grenzende äußere Korkzellenreihe ein zweischichtiges Phelloid folgt und so fort, abwechselnd Korkzellenschicht und aus dünnwandigeren Zellen bestehendes „passives Trennungsphelloid“ bis zu dem Bastbündelring. Übrigens ist die Reihenfolge und Ausbildung dieser zweierlei Zellschichten ungleichmäßig, was bereits

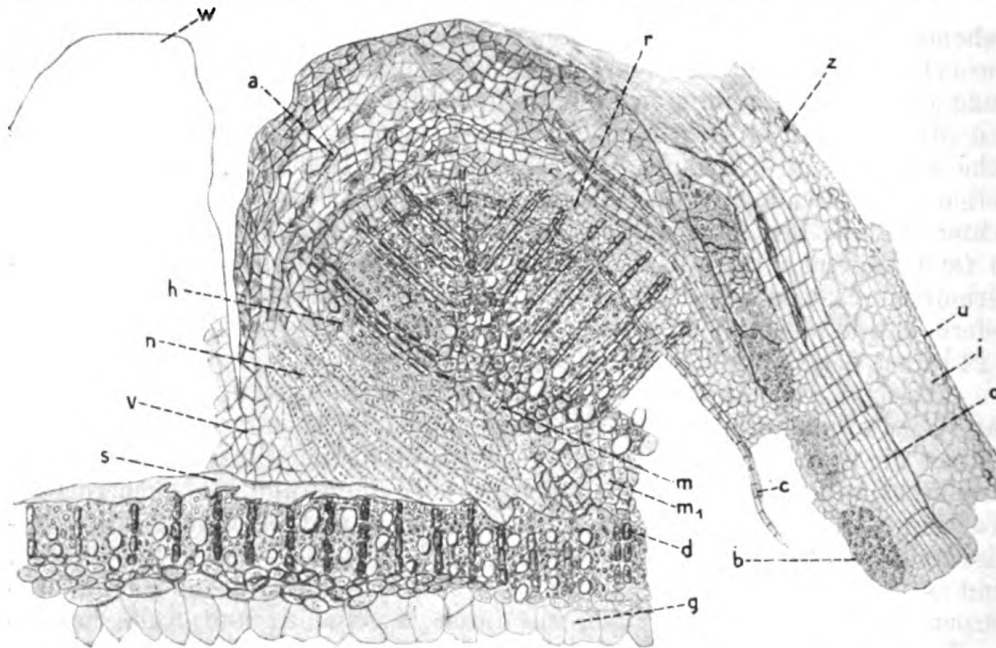


Fig. 9. Querschnitt durch die vernarbte Hagelschlagwunde am Achsenorgane von *Rubus idaeus* L. Vergr. 150. Die Überwallungswülste *w* sind miteinander verwachsen im unteren Teile in der Medianlinie über dem Spalte *s*, welcher den bloßgelegten alten Holzkörper von den überlagernden regenerierten Gewebekörpern trennt. *g* Markzellen. *d* normale Markstrahlen. *v* parenchymatisches Callusgewebe. *n* langzelliges, tracheales Wundholz. *h* in normales Gewebe übergehendes Wundholz. *a* Korkgewebsstränge im Überwallungswulste. *m*₁ kurzzelliges Wundholz und *m* Markstrahlzelle, woraus die Markstrahlen sich abzweigen. *r* Rindenteil. *c* Kambium. *z* alter Rindenkörper, im oberen Teile zerfetzt und abgestorben, worunter der Überwallungswulst hervorbricht. *n* Epidermis. *i* Collenchym. *o* Korkgewebe. *b* Bastfaserbündel.

Höhnel und Fritsch hervorhoben. Wenn Höhnel angibt, daß die Phelloidzellen stark verholzt seien, während Klebahn²⁾ und Fritsch behaupten, sie beständen aus Zellulose, so zeigen ihre Wandungen tatsächlich die Zellulosereaktion, indem sie sich mit Chlorzinkjod deutlich blau färben. Der innere Korkgewebegürtel geht aus dem Rindenparenchym hervor. Die Zellen der ersten sowie der zweiten auswärts an die Bastbündel

¹⁾ Nach einem Zitat bei K. Fritsch, Anatomisch-systemat. Studien üb. d. Gattung *Rubus*. (Sitzungsber. d. Wien. kaiserl. Akad. d. Wissensch. Bd. 95. 1887. p. 203.)

²⁾ Zitiert bei Fritsch, a. a. O.

grenzenden Rindenparenchymzellen werden zu Initialzellen für die Korkgewebebildung. Die länglich runden Zellen teilen sich durch tangentielle Scheidewände. Daneben treten auch radiale Zellteilungen auf. Zunächst erscheint in der Rindenparenchymzelle eine tangentielle Scheidewand, wodurch jene in zwei gleich große Zellen zerlegt wird. Von diesen beiden teilt sich alsdann wieder die äußere durch eine gleiche tangentielle Scheidewand, so daß jetzt drei übereinander liegende Zellen vorhanden sind. Die mittlere ist schmal tafelförmig und gibt die Phellogenzelle ab. Die inwärts gelegene, unmittelbar an die Bastzelle grenzende die Phellodermzelle. Es ist auffallend, daß die Korkgewebebildung zuerst beginnt in der Zellenregion vor den Bastfaserbündeln, darnach in der Zellregion zwischen den Bastbündeln. Indem sich die Phellogenzelle tangential teilt, entstehen zwei tafelförmige Zellen, wovon die äußere zur ersten Korkzelle wird. Man sieht alsdann in radiärer Anordnung vier Zellen übereinander liegen. Die unmittelbar an die Bastzelle grenzende untere Initialzellenhälfte wird zur Phellodermzelle, darauf folgt nach auswärts die Phellogenzelle, dann die Korkzelle und zu äußerst eine blasse, halbmond- oder tafelförmige Parenchymzelle. Eine andere Reihe zeigt, daß sich die über einer großen Phellodermzelle gelegene Phellogenzelle durch zwei radiale Scheidewände in drei kleinere Zellen geteilt hat, während die Korkzelle und die Parenchymzelle in zwei Zellen durch eine radiale Scheidewand zerfielen. In einem weiteren Stadium im einjährigen Achsenorgane erscheint sodann die zweite Korkzelle. Abgesehen von den Unregelmäßigkeiten, die bei der Verkorkung der Zellen vorkommen, präsentiert sich jetzt der innere Korkgürtel in der Weise, daß auf den im April angefertigten Querschnitt auf die Phellodermzelle eine Korkzelle folgt, woran sich die Zwischen- oder sogenannte Phelloidzelle schließt und danach wieder eine Korkzelle und Parenchymzelle. Die ein und andere Zwischenzelle sieht man in Teilung mit gewellter Scheidewand.

Die sekundäre Rinde setzt sich aus den unmittelbar an den Korkgürtel stoßenden und den Bastring durchbrechenden, großen, parenchymatischen Zellelementen der Markstrahlen der Rinde und aus den kleinzelligen, dickwandigen Rindenparenchymzellen sowie den Siebröhren zusammen. Der Cambiumring führt sodann zum Holzkörper hinüber. Über dessen Zusammensetzung äußert Fritsch¹⁾: „Sanio gibt für *R. idaeus* L. einfaches und gefächertes Libriform an, nebst Tracheiden, Gefäßen und Holz-

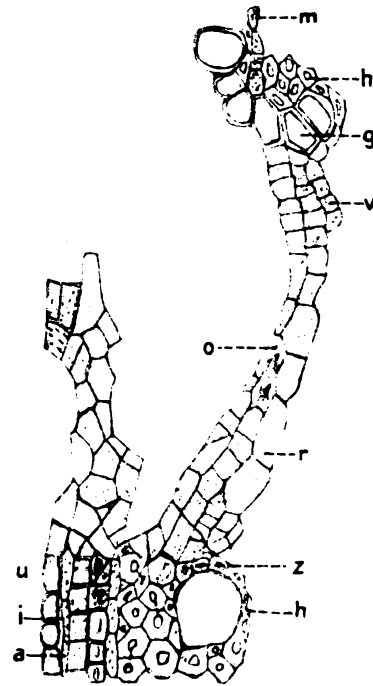


Fig. 10. Gewebspartie aus dem Vernarbungsgewebe der Hagelschlagwunde von *Rubus idaeus* L. Querschnitt. Vergr. 300. Der untere Teil in der Figur stellt das Holzgewebe mit einem Markstrahl vor der Verwundung dar. h normales Holzgewebe. a tracheale Markstrahlzellen. i Interzellulare. z Holzparenchymzellen. r langzelliges Wundholz im Überwallungswulste. o zerdrückte Zellen. v kurzelliges Parenchym. g Gefäße. m normale Markstrahlen.

¹⁾ A. a. O. p. 201.

parenchym. Ich konnte einen Unterschied zwischen Libriform und Tracheiden nicht finden, da alle faserartigen Elemente des Holzes Hoftüpfel zeigen. Schraubenförmige Verdickungen, wie sie an den Tracheiden von *Rosa*-Arten zu sehen sind, sah ich bei keinem *Rubus*.“

Im Gegensatz zu Fritsch kann ich die Angaben Sanios nur bestätigen. Zumal an radialen Längsschnitten ließen sich deutlich Tracheiden und einfache sowie die allerdings spärlicher auftretenden gefächerten Libriformfasern auseinander halten: die dünnwandigeren Tracheiden mit Hoftüpfel, die dickwandigeren Libriformfasern mit einfachen, großen, länglichen, an den Enden ausgezogenen und meist parallel zur Längsachse der Faser gerichteten Tüpfeln. Die Holzparenchymzellen hatten kleine runde Tüpfel, die Gefäße Hoftüpfel mit schrägem Längsspalt. Ebenso fand ich im Gegensatz zu Fritsch sowohl Tracheiden, wie Tracheen mit schraubenförmigen Verdickungen, und zwar in der Nähe des Marks, wo sie auch bei *Rosa*-Arten auftreten. Wenn sodann Fritsch bemerkt, daß wir es bei *Rubus* und den Rosaceen überhaupt mit einer augenscheinlichen Mittelform zwischen Libriformfasern und typischen Tracheiden zu tun haben, so trifft das zu, da Fasertracheiden auftreten. Die ein- bis vielreihigen Markstrahlen im Querschnitt setzen sich aus ungleichartigen Zellzügen zusammen. Es lassen sich liegende und stehende Markstrahlzellen unterscheiden. Auf dem Querschnitt der Hauptmarkstrahlen sieht man abwechselnd Reihen mit dreierlei Zellformen: gestreckte, tafelförmige und mehr kubische sowie schmale, langgezogene und überaus reich getüpfelte Zellen (Fig. 10a), wie sie auch unter den länglichen Zellen der Markkrone vorkommen. Wo die Markstrahlzellen an Gefäße und Tracheiden stoßen, stehen sie durch feine Porenkanäle mit diesen in Verbindung, wie auch unter sich. Unter sich sind die Gefäße, Tracheiden und Fasertracheiden durch Hoftüpfel zweiseitig verbunden. Zwischen Holzparenchymzellen und Gefäßen besteht Porenverbindung. Die Zellreihen der primären Markstrahlen breiten sich im Rindenkörper fächerartig aus und verlaufen bogenförmig nach dem Bastbündel- und Peridermringe. Zwischen den Markstrahlzellen erscheinen Interzellularen (Fig. 10 i).

Dem ungleichen anatomischen Verhalten der Markstrahlzellen von *Rubus idaeus* dürfte ein physiologisches entsprechen. Wenn man mit Strasburger¹⁾ eine Arbeitsteilung der Markstrahlzellen annimmt, insofern, als die einen der Leitung und Speicherung für Assimilate und dem Gasaustausch dienen, während die anderen in Beziehung zu den Wasserbahnen stehen, so wird unseren schmalen, langgezogenen, meist randständigen und porenreichen sowie stärkefreien oder doch stärkearmen Markstrahlzellen die letztere Funktion zufallen.

In der cambialen Region verhalten sich die Markstrahlzellen ungleich. Während im normalen wie im regenerierten Gewebekörper der Pomaceen, abgesehen von vereinzelten Ausnahmen, ein Markstrahlcambium vorhanden ist, tritt in den meisten Zellreihen der Markstrahlen von *Rubus idaeus* an Stelle der typischen Cambiumzelle die Markstrahlrindenzelle²⁾, und zwar

¹⁾ A. a. O. p. 210.

²⁾ Auf dieses Verhalten, wonach im Bereiche des Markstrahls die Cambiumzone eine Unterbrechung erleidet und die Markstrahlinitialen zu typischen Markstrahlzellen werden, hat Haberlandt bei verschiedenen Laubbölkern, besonders bei *Cytisus Laburnum* aufmerksam gemacht, indem er diese Erscheinung in Zusammenhang mit der lebhaften Stoffwanderung im Frühjahr und Herbst bringt. Durch diese stärkere Inanspruchnahme der Markstrahlinitialen für die Stoffwanderung voll-

gewöhnlich in rechteckiger Form im radialen Längsschnitt, welcher die histologischen Einzelheiten, wie Zellform, Zellwandverdickung und Tüpfelung am instruktivsten erkennen läßt. Die Holzmarkstrahlzellen in der cambialen Region heben sich deutlich durch die stark verholzten Zellwände ab und vor allem durch die Art ihrer Tüpfelung. Weniger Unterschied bietet der Zellinhalt. Die unmittelbar an die Holzmarkstrahlzelle anstoßende Rindenmarkstrahlzelle hat mit jener die tangentialen, bei ihr also die hintere Zellwand gemeinsam und damit die Tüpfelung der Holzmarkstrahlzellwand, während die vordere tangentialen Wandung eine schwach ausgeprägte Tüpfelung aufweist, die an den radialen Wandungen meist wegfällt. Zudem sind die Zellmembranen ungleich weniger verdickt, als bei den Holzmarkstrahlzellen. Wo die Cambiumzellen in einem Zellenzuge des Markstrahls erscheinen, da sind sie tafelförmig und schmaler, als die Markstrahlzellen und ohne Tüpfelung in den tangentialen und mit schwacher in den radialen Wänden. Zuweilen sieht man auch, daß die an die Holzmarkstrahlzelle grenzende Rindenmarkstrahlzelle radial geteilt ist. Der Masse nach geben dann die meist lufthaltigen, vereinzelt auch Stärkekörner und Kalkoxalatkrystalle enthaltenden großen Zellen des Markes den Hauptbestandteil des Holzkörpers des Himbeerachsenorgans ab.

Wenn wir nunmehr das histologische Bild der Überwallungswülste an Querschnitten studieren, so fällt sofort darin auf, daß die Anordnung des unterschiedlichen Wundholzes nicht regelmäßig ist, so daß zonenweise das eine auf das andere folgte. Gehen wir von den Markstrahlen und den Holzparenchymzellen des normalen Holzgewebes aus und verfolgen die sich unmittelbar an sie als ihre Fortsetzungen anschließenden Zellreihen des Wundholzes, so treffen wir nebeneinander kurzellige und langellige, tracheale Wundholzpartien. (Fig. 10 u. 11) Auf eine langgestreckte Gefäßzelle im Zuge einer Markstrahlzellreihe folgt eine viereckige Zelle parenchymatischen Charakters. Dann wieder lassen sich deutlich vier aufeinander folgende Wundholzregionen unterscheiden: auf das an das alte Holzgewebe anschließende kurzellige parenchymatische Wundholz folgt ein langelliges, gestrecktes, tracheales, dem sich nach der Rinde zu ein radiär angeordnetes, kurzelliges, parenchymatisches angliedert, worauf eine schmale und nur aus großen Gefäßen und Holzparenchymzellen bestehende Gewebszone folgt, die zu dem normalen Holzgewebe hinüberleitet, dessen Markstrahlen aus der parenchymatischen Gewebsregion über der Wunde entspringen (Fig. 10).

zoge sich ein Funktionswechsel, der histologisch dadurch zum Ausdruck komme, daß jene Zellen sich in Markstrahlrindenzellen umwandeln. Zu Beginn des erneuten Dickenwachstums werden dann durch Teilung der innersten Rindenstrahlzellen neue Markstrahlinitialen gebildet, die ein Folgemeristem vorstellen, das sich alljährlich erneut. (Haberlandt, *Physiolog. Pflanzenanat.* Leipzig 1884 u. 1909.) Gegen diese Darstellung wandte sich A. W i e l e r (Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch. Bd. 4. 1886. p. 73 u. 259) sowohl in anatomischer wie physiologischer Hinsicht; besonders hält er das Markstrahlcambium für kein Folgemeristem, was dann Haberlandt zu einer weiteren gründlichen Erörterung der Kontroverse veranlaßte. (Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch. Bd. 4. 1886. p. 145). — An Quer- und Längsschnitten, die im November von ein- und zweijährigen Zweigen des Goldregens hergestellt wurden, konnte ich mich überzeugen, wie überaus genau von Haberlandt die histologischen Einzelheiten dargestellt wurden gegenüber den W i e l e r'schen Angaben. Man trifft nun in ein und demselben Markstrahl in der einen Markstrahlzellreihe die typischen Cambiumzellen und dicht daneben in der Nachbarreihe fehlen sie und an ihrer Stelle erscheinen Markstrahlrindenzellen in dem von Haberlandt näher beschriebenen Bau. Ob es aber zwingend ist, für die ihres cambialen Charakters entkleideten Markstrahlzelemente einen Funktionswechsel anzunehmen, das stehe dahin.

In der Zone des trachealen Wundholzes sieht man verschiedentlich gelbbraune Rißlinien an Stelle von abgestorbenen, zerdrückten Zellen (Fig. 10 o). Weiter medianwärts, wo der Überwallungswulst über den bloßgelegten Holzkörper der Hagelwunde streicht, besteht er in seiner Hauptmasse aus einem trachealen Wundholzgewebe, dessen Stränge schräg nach aufwärts gegen die Mittellinie steigen (Fig. 9 n). Auch erscheinen wohl — und das betrifft eben das Verhalten der Markstrahlen — Querschnittsbilder, wo in der Wundregion ein bis dahin normal gebauter, aus sechs und mehr Zellreihen bestehender primärer Markstrahl eine kurze Strecke vor dem Rindenkörper seine Zellelemente plötzlich verändert zeigt. Statt der normalen Holzmarkstrahlzellen sehen wir über die ganze Breite des Markstrahls sich ausdehnende, schräg tangential gestreckte Holzfasern, die in der Cambiumzone alsdann den Charakter der Cambiumzellen haben, jedoch nicht allemal.

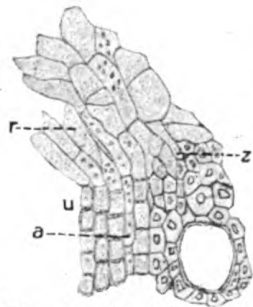


Fig. 11. Gewebspartie aus dem lateralen Teile des Überwallungswulstes der Hagelschlagwunde von *Rubus idaeus*. Querschnitt. Vergr. 300. u normales Holzgewebe vor der Verwundung mit einem Markstrahl, das unmittelbar übergeht in ein tracheales langzelliges Wundholzgewebe. a tracheale Markstrahlzellen. z Holzparenchymzellen. r langzelliges tracheales Wundholzgewebe.

Darüber liegen als Fortsetzung des Markstrahls im Rindenkörper die großen länglichen Parenchymzellen, hin und wieder in Teilung begriffen in der Nähe der Bastbündel. Wie de Vries¹⁾ in seiner Arbeit über Wundholz schon beschreibt, nimmt die Differenzierung des Wundholzes gegen die Wunde hin allmählich ab, so zwar, daß hier das Markstrahlzellgewebe in seiner Gleichmäßigkeit vorherrscht und der Unterschied zwischen parenchymatischem Holze und Markstrahlzellgewebe verwischt ist. Unmittelbar seitwärts von dem vorher gekennzeichneten Markstrahl nach dem medianen Teile der Wunde zu begann im normalen Holzgewebe die braune Wundlinie, die in unregelmäßigem Verlaufe und Seitenäste aussendend, das Markstrahlzellgewebe bzw. Wundholzgewebe durchsetzte. Weiterhin lief sie in den freien Wundrand (Fig. 9 s) des bloßgelegten Holzkörpers über, dessen Gewebelemente wie bei den gleichen Wunden der Pomaceenzweige eine weitgehende Subarinallamellenbildung und Wundgummibildung aufwiesen. An den Querschnitten war ferner zu erkennen, wie die Zellelemente des Wundholzes der gegen einander in der Mittellinie der Wundfläche wachsenden Überwallungswülste bei dem Überdecken der abgestorbenen Gewebe der Wundfläche des Holzkörpers, wie jene Zellen mit ihren Endstücken in die verletzten offenen Gefäße der Wundfläche wuchsen und diese teilweise ausfüllten. Ebenso

waren hie und da die Holzparenchymzellen des freien Wundrandes durch den Druck des auflagernden Wulstes zusammengepreßt. An anderen Stellen erschienen sodann Gewebsbrücken zwischen der freien Wundfläche des Holzkörpers und den über sie hingleitenden Wülsten, hergestellt aus den stark verdickten Wänden der einander gegenüber liegenden Gewebeteile: ein mechanisches Aneinanderlagern, aber keine Verwachsung.

Wenden wir uns nunmehr den meristematischen Geweben zu, indem wir das Cambium seitwärts aus dem normalen Zweigteile nach der Mittellinie hin in den Überwallungswulst verfolgen, so verläuft es hier, den schnecken-

¹⁾ Flora. Jg. 59. 1876. p. 2 ff.

förmigen Holzkörper des Wulstes in einer Schleife umziehend, bis zu dem Grunde des Überwallungswulstes, wo das parenchymatische Wundholz- und das Markstrahlzellgewebe sich ausbreitet. Hier im unteren medianen Randteil des Wulstes taucht auf der Grenze zwischen dem langzelligen gefäßartigen Wundholz und dem darüber gelegenen parenchymatischen Callusgewebe eine meristematische Zone auf, die in einer Wellenlinie und parallel zum äußeren Wulstrand durch den unteren Überwallungswulstteil streicht und zu der Cambiumschleife hinüberführt. Solche selbständigen Meristeme, die vom normalen Cambium getrennt bleiben, oder auch mit ihm in Verbindung treten können, kommen im Callus häufiger vor.

Der Rindenteil der Überwallungswulste zeichnet sich durch die Gleichförmigkeit seiner Gewebsmassen sowie durch eine noch weitergehende Korkgewebsbildung, als im normalen Rindenkörper aus (Fig. 9 a). Zu einer Epidermisbildung war es nicht gekommen; es entstehen in dem regenerierten Gewebskörper nur Peridermschichten. Auch H. T i t t m a n n ¹⁾ hat bei den von ihm untersuchten Pflanzen keine Epidermisneubildung nach Verletzung der Oberhaut feststellen können, sondern es bilde sich eine Korkschicht, welche die Funktion der Epidermis übernehme. — Auf das regenerierte Periderm, das aus mehreren Schichten von unregelmäßig viereckigen, wie zerdrückt erscheinenden Korkzellen besteht und auf dem streckenweise noch die Gewebsreste der ursprünglichen Rinde saßen, tritt im Callusgewebe inwärts das vorhin beschriebene innere Korkgewebe mit seinen abwechselnden Phelloidzellschichten auf. Und zwar lagen drei Korkzellenbänder mit je zwei Zellschichten übereinander und mit je der entsprechenden Phelloidzellschicht. In dem gegen die Mittellinie des Achsenorgans gerichteten Wulstteile war es noch nicht zur Bildung von Bastbündeln gekommen. Dickwandige Rindenparenchymzellen machten im Verein mit den Rindenmarkstrahlzellen das Rindengewebe aus. Weiter lateralwärts jedoch, nach der unverletzten Seite des Achsenorgans hin traten in dem Überwallungswulste Bastfaserbündel auf, umgeben von Korkzellenzonen, die alsdann gegen das normale Gewebe des Achsenorgans hin verschwanden. Man sah, wie in dem Rindenparenchym die Bastfaserzellen einzeln und in Gruppen von 2—6 Zellen vorkamen, welche direkt aus den Rindenzellen hervorgegangen waren.

Wenn wir schließlich noch zum Vergleich einen Blick auf die Querschnitte durch die Hagelschlagwunden an den Achsenorganen von *Rosa canina*, *Prunus triloba* und *Hydrangea hortensis* werfen, so geben uns die mikroskopischen Bilder eine weitere Bestätigung der Tatsache, daß die Bildung und das Wachstum der Gewebselemente in dem Calluskörper der verschiedenen dikotyledonen Gewächse sich im großen und ganzen in derselben Weise vollzieht nach der gleichen Art der Verletzung, die in unseren Fällen meist eine bis auf den Holzkörper gedrungene Schlag- oder Quetschwunde in der Längsrichtung des Achsenorgans war. Ein verhältnismäßig einfaches histologisches Bild zeigt der senkrechte Durchschnitt durch den Überwallungswulst der Hagelschlagwunde am Rosenzweige. Die Gewebspartie des unteren und die freie Wundfläche überdeckenden Randteils des Wulstes besteht aus vorzugsweise trachealen Zellelementen, die in radialen, schräg nach aufwärts gegen die Rinde hin verlaufenden Zügen angeordnet sind. Sie gehen in ein normales, von einreihigen Markstrahlen

¹⁾ Beobachtungen über Bildung u. Regeneration d. Periderms, der Epidermis, d. Wachsüberzugs u. d. Cuticula einiger Gewächse. (Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. Bd. 30. 1897. p. 127.)

durchsetztes Holzgewebe über, das fast ganz gefäßlos ist. Nur im unteren Teile treten vereinzelt Gefäße auf, während im oberen, an den Rindenkörper des Überwallungswulstes grenzenden Teil gar keine Gefäße sind. Er setzt sich aus Holzparenchym- und Holzfaser-elementen zusammen. Die gleiche radiäre Zellenanordnung wie im Holzkörper tritt auch im Rindenkörper auf, der von einer breiten Peridermzone umgrenzt ist. Das Rindenparenchym besteht aus dickwandigen länglichen Zellen.

Um aus den Regenerationsgeweben der Hagelschlagwunden der übrigen angeführten Holzgewächse nur das Charakteristische hervorzuheben, so war bei *Prunus triloba* der breite Peridermgürtel, welcher den Überwallungswulst schleifenförmig umgrenzte und gegen die Außenwelt abschloß bis zu der über der Wunde sich ausbreitenden Parenchymholzpartie im unteren medianen Wulstteile vorgedrungen. Bei *Hydrangea hortensis* schloß sodann in der Wundregion das tracheale Wundholz unmittelbar an das alte Holzgewebe des verletzten Achsenorgans an. Und aus jenem ging direkt der größtenteils aus Tracheiden, Gefäßen und Fasertracheiden bestehende normale Holzteil des Wulstes hervor. Auch S o r a u e r¹⁾ berichtet, daß bei sehr schwach entwickelten Ringelwülsten an der Weinrebe das Parenchymholz manchmal direkt in normal gelagerte schwach verdickte Holzelemente übergehe, ohne daß kurze Gefäßzellen vorher auftreten. Der neugebildete Holzteil ist nicht, wie das sonst wohl bei den anderen Holzgewächsen der Fall war, gefäßarm in einem Teile, sondern durchweg eher gefäßreich, was charakteristisch für das Holzgewebe der Hortensie ist. Der Rindenkörper bestand aus dickwandigen Parenchymzellen in radiärer Anordnung. Nesterweise traten in ihm große, stark verholzte und reich getüpfelte Sklerenchymzellen auf, eine Erscheinung im Regenerat, der wir früher schon mehrfach begegnet sind. Ein mehrschichtiges, aus großen rechteckigen Zellen bestehendes Periderm schloß sich nach auswärts an das Rindengewebe, das, wie der regenerierte Holzkörper nur eine geringe Differenzierung seiner Gewebselemente zeigte.

Verwachsung der regenerierten Gewebekörper miteinander.

Die schon mehrfach erwähnten braunen Rißlinien in der Wundregion des verletzten Holzkörpers entstehen bekanntlich dadurch, daß die Reste abgestorbener Zellen zwischen die Zellwände gepreßt werden. Aber sie zugleich als die Grenzlinien der im Regenerationsprozeß miteinander verwachsenden Gewebe anzusprechen, das würde verfehlt sein. Denn, worauf F. H e r s e²⁾ schon aufmerksam machte, es werden die Zellreste der abgestorbenen Wundgewebsteile von den ungleichmäßig wachsenden Zellen ganz verschiedenartig zur Seite gedrängt, so daß jene auch zwischen die Zellwände von Zellen gleicher Abstammung geraten. Eine Entscheidung hierüber wird um so schwerer, als bei der offenen Wunde infolge des aufgehobenen Rindengürteldrucks und der stärkeren Verdunstung ungleiche Gewebsspannungen entstehen, die sowohl im ursprünglichen Gewebekörper, wie im regenerierten Risse verursachen. So trifft man denn auch in dem Markstrahlengewebe im unteren lateralen Teile des Überwallungswulstes nicht selten gelbe Rißstellen.

Wie aber kommt nun eine Verschmelzung der beiden gegeneinander wachsenden Calluskörper zustande? In welcher Weise vereinigen sich die

¹⁾ Handb. d. Pflanzenkrankh. Bd. 1. 1909. p. 783.

²⁾ A. a. O. p. 96.

aufeinander stoßenden Zellen? Dies gewiß überaus interessante Problem ist mehrfach, zumal von Vöchting und von Strasburger, zum Gegenstand eingehender Untersuchungen gemacht. Und insoweit ist es auch gelöst, als Vöchting¹⁾ korrespondierende Tüpfel in den aufeinanderstoßenden Zellwandungen zwischen dem derberen Gewebe eines Rübensprosses und dem zarteren einer Wurzel nachweisen konnte, während Strasburger²⁾ denselben Nachweis führte bei Verwachsungen von Pfröpfingen von *Abies nobilis* auf *Abies pectinata* und *Hyoscyamus niger* auf *Solanum tuberosum*. Korrespondierende Tüpfel und Plasmaverbindungen, so äußert sich Strasburger, werden zwischen Reis und Unterlage ausgebildet.

In solchen Fällen, wo das aus den vereinigten Produkten zweier verschiedenen Kambien hervorgegangene intermediäre Gewebe durchweg korrespondierende Tüpfel nach Strasburger besaß oder wo aus der ungleichen Struktur der verwachsenden Gewebe die Verwachsungslinie erkennbar ist, da wird sich „die sekundäre Tüpfelbildung“ feststellen lassen. Ebenso wenn Reis und Unterlage verschiedener Art sind aus der ungleichen Chromosomenzahl der aufeinander treffenden Zellen der verwachsenden Gewebekörper. Aber anders ist ein sicherer Nachweis der Grenzzellen an der Verwachsungslinie und die Art ihrer Verschmelzung kaum möglich. Die Überwallungswülste der bis auf den Holzkörper gedrunkenen Hagelschlagwunden bei den Pomaceen waren vierzehn Monate nach der Verletzung in der Mittellinie über der bloßgelegten Wunde aufeinander getroffen, wobei sie eine in der Längsrichtung verlaufende Narbenrille äußerlich hinterlassen hatten. Es machte so den Eindruck, als seien unterhalb dieser Rille die Wülste miteinander verwachsen. Sowie man jedoch einen Durchschnitt durch das Regenerat machte, dann stellte sich heraus, daß die Wülste in der Mittellinie nicht verwachsen waren, sondern nur mit ihrem Periderm fest gegeneinandergepreßt. Sie überwölbten die tiefbraune Wundoberfläche des Holzkörpers, so daß auf dem Querschnitt ein klaffender Spalt zwischen den unteren Flächen der Wülste und der freien Wunde des Achsenorgans bestand. Anders war das Verhalten bei *Rubus idaeus*. Hier waren die unteren medianen Ränder der Wülste miteinander verwachsen. Aber welche Zellen, das ließ sich mit Bestimmtheit nicht feststellen. Der Entscheid, welche Calluszellen gehören dem rechten und welche dem linken Überwallungswulste an, diese Entscheidung mußte willkürlich ausfallen.

Um überhaupt eine Einsicht in den Verwachsungsvorgang zu gewinnen, hatte ich im Juni einen gekappten Himbeerschößling über eine Strecke hinweg gespalten und die getrennten Hälften wieder gegeneinander gelegt und mittelst Bastfadens verbunden, also eine Anplattung der beiden Hälften des zerschlitzten Achsenorgans vorgenommen. Nach vier Wochen untersuchte ich an Querschnitten das halbierte und wieder zusammengewachsene Achsenorgan, worüber ich an anderer Stelle zu berichten gedenke.

Vergleichende Zusammenfassung der Hauptergebnisse.

Was bei einer vergleichenden Betrachtung der durch die Hagelschlagwunden hervorgerufenen und auf den Ersatz der abgestorbenen Gewebs-

¹⁾ Über Transplantation am Pflanzenkörper. (Untersuch. z. Physiol. u. Pathol. Tübingen 1892. p. 114 u. 119.)

²⁾ Plasmaverbindungen pflanzlicher Zellen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 36. 1901. p. 584.)

partien gerichteten Regenerationsvorgänge gegenüber den normalen Gewebs- und Organbildungen besonders auffällt, das ist wie auch bei anderen Wundheilungsprozessen neben einer weitgehenden Zellenverkorkung und der geringeren Differenzierung der entstandenen Gewebsmassen die Bildung neuer Gewebselemente, die im normalen Gewebskörper nicht vorkommen, sowie eigener Schutzgewebe in Gestalt von Korkzellagen, ferner die Beteiligung der ungleichsten Gewebearten an dem Aufbau der Regenerate, also die infolge der Verwundung bewirkte Auslösung latenter Zellvermögen und weiter das eigentümliche Verhalten der Markstrahlen, die im Verein mit den Holzparenchymzellen durch Teilung und ein hypertrophisches Wachstum ihrer Zellen ein Markstrahlzellengewebe entstehen ließen.

Wir sahen, daß die großen Fruchtfleischzellen durch radiale und tangentielle Teilungen zerlegt wurden und es weiterhin zur Bildung eines in seinen Zellelementen radiär angeordneten Wundkorkgewebes kam, wie sodann in der Hagelschlagwunde der Birnfrucht zu der Korkzelle die Sklerenchymzelle tritt, welche direkt aus der Fruchtfleischzelle hervorgeht und ferner eine unmittelbare Verbindung mit jener eingeht und so ein zusammenhängendes Kork-Sklerenchymgewebe bildete, indem die nach der Wundfläche gerichteten Zellradien im vorderen Teile aus Korkzellen und im hinteren Teile aus Sklerenchymzellen bestanden, wobei hin und wieder noch meristematische Zwischenzellen vorkamen.

Ebenso gingen die Sklerenchymzellen in dem regenerierten Rindengewebe der Hagelschlagwunden der Pomaceen direkt aus den Rindenparenchymzellen und aus Markstrahlzellen des Rindentils hervor. Und es erschienen die Sklerenchymbündel in Gemeinschaft mit den Bastfaserbündeln zur Bildung eines geschlossenen mechanischen Bündelringes. Es ist das jedenfalls ein interessantes Vorkommnis, als hier ein Organ in einem regenerierten Gewebekörper auftritt, welches dem normalen Rindenkörper unserer Pomaceen fehlt, während es bei zahlreichen anderen Holzgewächsen vorhanden ist. Auch F. Zach¹⁾ berichtet, daß derartige sklerenchymatische Elemente bei *Phyllocactus Ackermanni* nicht als normale Bildungen vorkommen, sondern Neubildungen seien, entstanden infolge von Verwundung.

Herbst sowie Driesch²⁾ führen die Entstehung von der Pflanze fremden Geweben (Sklerenchymring) „auf eine starke Transpiration zurück und zählen derartige Bildungen zu den „formativen Regulationen“.

Darnach sähen wir also, wie ein einzelner äußerer Umstand, hier also eine starke Transpiration der Gewebsmassen, wie dieser einzelne Umstand ein Organ im regenerierten Gewebekörper entstehen läßt, das dem normalen Rindenkörper der Pomaceen fremd, aber sonst bei zahlreichen anderen Holzgewächsen vorkommt. Man könnte aber auch, wenn wir nach einer Erklärung suchen, diese finden in der Phylogenese der Gewebe. Darnach wäre das Sklerenchym eine Gewebeart, welche bei den betreffenden Pflanzen einstmals in ihrem normalen Gewebekörper verschwand. Aber unter bestimmten äußeren Einwirkungen, wie sie die Verwundung mit sich brachte, in dem regenerierten Gewebe wieder auftauchte als atavistische Erscheinung. Es wird da im pflanzlichen Organismus nicht wesentlich anders sein, als im tierischen, von dem wir aus zahlreichen Fällen wissen, daß im Re-

¹⁾ Über Vernarbung bei Pflanzen. (33. Jahresber. d. k. k. Kaiser Franz Josef-Staats-Ober-Gymnas. zu Sz. 1906.)

²⁾ Die organischen Regulationen. 1901. p. 28.

generat atavistische Züge erscheinen, die sowohl in der Embryonalentwicklung, als auch sonst verborgen geblieben, latent in den Zellen schlummernd, wenn sie nicht durch besondere äußere Umstände zum Hervortreten gezwungen wären¹⁾. Wir können deshalb mit E. S c h u l t z wohl sagen, daß die Regeneration somit phylogenetische Merkmale festhält.

Unsere Untersuchungen erbrachten sodann den Nachweis, daß das regenerierte Periderm wohlausgebildete Lentizellen besitzt. Andere Eigenartigkeiten des Regenerats bestanden in dem Auftreten von Chromoplasten und Kalkoxalat in den Rindenzellen sowie isolierter Bastfaserbündel und Holzkörper im Rindengewebe. Die verschiedenen Reaktionen des pflanzlichen Organismus auf die Hagelschlagverletzungen fanden aber ihren bemerkenswertesten Ausdruck in dem hypertrophischen Wachstum der Markstrahlzellen und der Holzparenchymzellen in der Wundspähre. Über abnorm verbreiterte Markstrahlen finden sich vielfach Angaben in der Literatur. So heißt es bei K ü s t e r²⁾, daß sie in verbänderten Zweigen auftreten. Und S o r a u e r berichtet über einen Fall im Rosenachsenorgan, der wahrscheinlich auf allzureiche Ernährung zurückzuführen sei. Ferner gibt S o r a u e r³⁾ an, daß bei Schälwunden bis auf den bloßgelegten Holzkörper sich in den Markstrahl- und jugendlichen Holzzellen, die unmittelbar unter der Wundfläche liegen, der Zellinhalt vermehre und durch Neubildung werde häufig der Markstrahl verbreitert, indem seine seitlichen Zellen sich fächerartig über die angrenzenden Holzzellen auszubreiten suchten. — Zu einer Markstrahlzellgewebsbildung kommt es auch in den Kropfmasern oder Tumoren des Apfelbaumes. Die Verbreiterung beruhe, wie J. J a e g e r⁴⁾ bemerkt, auf einer Zellvermehrung und gleichzeitiger Vergrößerung der einzelnen Markstrahlzellen. Den ersten Anstoß für die Markstrahlenwucherung könnte, wie J. J a e g e r meint, irgendwelche unbekannte Ernährungsstörung oder Frostbeschädigung geben. Und P. J a c c a r d⁵⁾ erwähnt, daß bei der durch Längsdruck hervorgerufenen Wellenholzbildung bei *Picea excelsa* die ganz verschiedene Breite der Markstrahlen sehr auffallend sei. R. H a r t i g⁶⁾ hatte schon früher dargelegt, daß das Knäul- oder Wimmerholz oft durch einen Längsdruck hervorgerufen wurde. J a c c a r d⁷⁾ berichtet auch von einer Wundholzbildung mit abnormen tracheidalen Zellen und mit Markstrahlzellcharakter im Marke infolge von Druck der umgebenden Gewebe auf die Markzellen, ein Befund, der übereinstimmt mit gleichlautenden früheren M ä u l e s⁸⁾, der bei *Evonymus europaea* feststellte, daß sich nach einer Rinden- und ohne Markverletzung im Marke ein Cambium bildete und weiterhin Wundholz, Vorgänge, denen sich das von uns vorhin geschilderte Verhalten der Markstrahlen im Holzkörper der Hagelschlagwunden der Pomaceen anschließt. Auch da entstand in Gestalt der verbreiterten, wuchern den Markstrahlen ein Markstrahlparenchym im Holzkörper nach Rinden-

¹⁾ S c h u l t z, E., Über das Verhältnis der Regeneration zur Embryonalentwicklung und Knospung. (Biolog. Centralbl. Bd. 22. 1902. p. 360.)

²⁾ Patholog. Pflanzenanat. Jena 1903. p. 182.

³⁾ Handb. d. Pflanzenkrankh. Berlin 1909. Bd. 1. p. 729.

⁴⁾ Über Kropfmaserbildung am Apfelbaum. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 18. 1908. p. 260.)

⁵⁾ Étude anatom. des bois comprimés. (Mitt. d. schweiz. Centralbl. f. d. forstl. Untersuchungswesen 1910; nach einem Referat in Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 1911. p. 429.)

⁶⁾ Nach einem Zitat bei K ü s t e r, a. a. O. p. 177.

⁷⁾ A. a. O.

⁸⁾ Zitiert bei K ü s t e r, a. a. O. p. 180.

verletzungen. Aus den Zellelementen der abnormalen Markstrahlen gingen ferner Holzgewebelemente und im Rindenkörper Sklerenchymzellen hervor. Letzteres kommt auch bei den Abietineen vor. Während die normalen Markstrahlzellen meist langgestreckt und tafelförmig auftreten, sind die Zellen der abnormalen Markstrahlen viereckig, keilförmig, länglich, tangential gestreckt oder von ganz unregelmäßiger Gestalt. Ihre Wandungen haben einfache, runde Tüpfel. Die trachealen Gewebelemente zeichnen sich durch große längliche Tüpfel aus. Im maserigen oder „wimmerigen“ Wundholze findet man sodann kurze, tonnenartige Tracheiden mit länglichen Tüpfeln, die quer zur Längsachse gestellt sind. Ebenso mit Hoftüpfeln mit Längsspalt parallel zur Längsachse der Tracheide. Die verbogenen Fasertracheiden haben Hoftüpfel.

Die Knäuelbildung der Holzelemente führen bekanntlich Vöchting und Mäule auf die Polarität der Zellen zurück, während nach der älteren Anschauung das Vorhandensein zahlreicher Adventivknospen den Faserverlauf bedingt. Frank¹⁾ wiederum ist der Ansicht, daß Maserholz auch ohne Beteiligung von Adventivknospen oder sonstigen dem Cambium fremden Körpern, nämlich durch eine bloße, vom Cambium ausgehende veränderte Zusammensetzung des Holzes, insbesondere durch Verbreiterung der Markstrahlen entstehe.

Küster²⁾ erscheint der Erklärungsversuch Mänles nicht gerade überzeugend, und Soraue³⁾ erklärt die Erscheinung aus dem ungleichen Rindendruck, eine Ansicht, die wohl vielfach geteilt wird⁴⁾.

Zu den Abwegungen von dem normalen Verhalten gehört es weiter, daß Markstrahlen auftreten, deren Zellen im oberen, an den Rindenkörper des Regenerats stoßenden Teil plötzlich eine derartige Verholzung ihrer Wandungen zeigen, daß sie als tangential gestreckte Holzgewebelemente angesprochen werden müssen.

Im Wundholzgewebe von *Rubus idaeus* traten sodann ähnliche Markstrahlbildungen auf wie in den Regeneraten der Pomaceen. Während jedoch deren regeneriertes Oberhautgewebe wohlentwickelte Lentizellen besaß, zeigte es bei *Rubus idaeus* weiter keine Differenzierung, da es zu keiner Epidermisbildung gekommen war. Dahingegen machte sich eine weitgehende Korkgewebsbildung im Rindenkörper geltend.

Was sodann die Verschmelzung der gegeneinanderwachsenden Überwallungswülste betrifft, so ist bei der gleichen Struktur der aufeinanderstoßenden und wie bei *Rubus idaeus* verwachsenden Zellelemente die Verwachsungsart nicht nachzuweisen.

Literaturverzeichnis.

Driesch, H., Die organ. Regulationen. Vorbereitungen zu einer Theorie des Lebens. Leipzig 1901.

Frank, A. B., Die Krankheiten der Pflanzen. Breslau 1885.

Haberlandt, G., Physiolog. Pflanzenanat. 4. Aufl. Leipzig 1909.

Hesse, F., Beiträge zur Kenntnis der histologischen Erscheinungen bei der Veredelung der Obstbäume. (Landwirtsch. Jahrb. Berlin 1908.)

¹⁾ A. a. O. p. 84.

²⁾ A. a. O. p. 179.

³⁾ A. a. O. p. 851.

⁴⁾ Vgl. auch: Krabbe, G., Über d. Beziehung d. Rindenspannung zur Bildung der Jahrringe u. zur Ablenkung d. Markstrahlen. (Sitzber. d. Königl. Akad. d. Wissensch. zu Berlin. 1882.) — Hoffmann, Rob., Untersuch. üb. d. Wirkung mechan. Kräfte auf d. Teilung, Anordnung u. Ausbildung d. Zellen b. Aufbau des Stammes der Laub- und Nadelhölzer. [Dissert.] Berlin 1885.

- Hoffmann, Rob., Untersuch. üb. d. Wirkung mechan. Kräfte auf d. Teilung, Anordnung u. Ausbildung d. Zellen b. Aufbau d. Stammes der Laub- u. Nadelhölzer. [Dissert.] Berlin 1885.
- Jaccard, P., Étude anatom. des bois comprimés. (Mitt. d. schweiz. Centralbl. f. d. forstl. Untersuchungswesen. 1906.)
- Jaeger, J., Über Kropfmaserbildung am Apfelbaum. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 18. 1908.)
- Kaßner, P., Untersuch. üb. Regeneration d. Epidermis. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 20. 1910.)
- Krabbe, G., Über d. Beziehung d. Rindenspannung z. Bildung d. Jahresringe u. z. Ablenkung d. Markstrahlen. (Sitzber. d. Königl. Akad. d. Wissensch. zu Berlin. 1882.)
- Kuhla, F., Über Entstehung u. Verbreitung d. Phelloderms. (Bot. Centralbl. Jg. 18. 1897.)
- Küster, E., Patholog. Pflanzenanat. Jena 1903.
- Küster, E., Aufgaben u. Ergebnisse d. entwicklungsmechan. Pflanzenanat. (Progr. rei botan. Bd. 2. 1908.)
- Mäule, C., Der Faserverlauf im Wundholz. (Bibl. bot. 1895.)
- Meyer, A., Botan. Praktikum. Jena 1907.
- Schultz, E., Über d. Verhältnis d. Regeneration z. Embryonalentwicklung u. Knospung. (Biolog. Centralbl. Bd. 22. 1902.)
- Simon, S., Experimentelle Untersuch. üb. d. Differenzierungsvorgänge im Callusgewebe v. Holzgewächsen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 45. 1908.)
- Sorauer, P., Handbuch d. Pflanzenkrankh. Berlin 1909.
- Strasburger, E., Bau u. Verrichtung d. Leitungsbahnen in d. Pflanzen. Jena 1891.
- Strasburger, E., Plasmaverbindungen pflanzl. Zellen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 36. 1901.)
- Tittmann, H., Beobachtungen üb. Bildung u. Regeneration d. Periderms, d. Epidermis, d. Wachsüberzuges u. d. Cuticula einiger Gewächse. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 30. 1897.)
- Vöchting, H., Untersuchungen z. experim. Anat. u. Pathol. d. Pflanzenkörpers. Tübingen 1908.
- Vöchting, H., Über Transplantation a. Pflanzenkörper. (Untersuch. z. Physiol. u. Pathol. Tübingen 1892.)
- de Vries, Über Wundholz. (Flora. 1876.)
- Zach, F., Über Vernarbung bei Pflanzen. (33. Jahrb. d. k. k. Kaiser Franz Josef-Staats-Ober-Gymnas. zu Sz. 1906.)

Nachdruck verboten.

Le contrôle rapide des eaux potables par les cultures sur Agar au Neutralrot.

[Institut d'Hygiène et de parasitologie de l'Université de Lausanne.]

Par B. Galli-Valerio et M. Bornand.

Plus on s'occupe de la question des eaux potables, et plus on essaye de trouver des méthodes permettant de constater de la façon la plus rapide possible la pollution de ces eaux. Ces méthodes sont surtout de la plus grande importance pour les armées en campagne ou en manoeuvres; car il est indispensable de renseigner le plus vite possible les commandants des troupes sur la potabilité ou non des eaux d'une contrée donnée.

Préoccupés de porter une contribution à la solution de cet important problème, depuis le printemps de 1911 nous avons fait une série de recherches au laboratoire et à la campagne, pour établir si par l'association de deux analyses chimiques et d'une analyse bactériologique très simple, il était possible de juger assez rapidement, de la potabilité d'une eau.

Les procédés auxquels nous nous sommes arrêtés sont les suivants: Celui de Trillat et Turchet¹⁾ pour la recherche de l'ammoniaque; celui de Griess²⁾ modifié par Hosvay v. Ilosva et par Lunge pour la recherche des nitrites, et celui de Rothberger-Scheffler³⁾, modifié par Oldekop pour la recherche de *Bact. coli*.

Le procédé de Trillat et Turchet consiste en ceci: On prépare une solution de iodure de potassium pur dans l'eau distillée à 10 % et une solution concentrée d'hypochlorite de soude du commerce (Eau de Javel) qu'on garde dans deux flacons compte-gouttes séparés. On introduit 20 à 30 cc de l'eau à examiner dans une éprouvette et on ajoute 3 gouttes de la solution de iodure de potassium et deux gouttes d'eau de Javel; s'il y a plus de deux milligrammes d'ammoniaque par litre d'eau, on voit apparaître une coloration brune et même un précipité brun noirâtre. Les expériences faites par nous au laboratoire, nous ont en effet démontré que par ce procédé on peut déceler la présence de 2 milligrammes d'ammoniaque par litre d'eau; mais la solution d'eau de Javel doit être souvent renouvelée. Pour des quantités plus petites d'ammoniaque, comme Trillat et Turchet ont démontré, on peut avoir un résultat en évaporant l'eau en présence d'une petite quantité d'acide sulfurique, qu'on neutralise grossièrement au moment de l'expérience. Par ce procédé on peut alors déceler l'ammoniaque, à une dilution de plusieurs millionsièmes.

Le procédé de Griess modifié par Hosvay v. Ilosva et par Lunge réclame la préparation du réactif suivant:

- a) acide sulfanilique, gr. 0,5 acide acétique à 10—20 % 150 cc.
- b) α -naphtylamine solide gr. 0,2.

Faire bouillir dans 20 cc d'eau distillée; on décante la solution aqueuse qu'on traite par 150 cc d'acide acétique à 10—20 %. On mélange les deux solutions a et b et on garde le réactif ainsi préparé dans des flacons jaunes et dans l'obscurité.

Si on ajoute 1—2 cc de cette solution à 50 cc d'une eau contenant des nitrites, on obtient une coloration rouge ou rose suivant la quantité des nitrites.

Scala⁴⁾ a pu par ce procédé, mettre en évidence 1 partie d'acide nitreux dans 1.000.000.000 de parties d'eau en laissant agir pendant 24 h.

Nous avons constaté que ce réactif peut déceler 0,001 mgr. de nitrite de soude dans un litre d'eau. Dans ce cas, une légère coloration rose apparaît après 5 minutes. Le réactif de Griess peut se conserver actif pendant une année, à condition de la garder dans des flacons incomplètement remplis, bien fermés et dans l'obscurité.

Le procédé de Rothberger-Scheffler, modifié par Oldekop, consiste à ensemercer sur agar au neutralrot l'eau à examiner.

Comme on le sait, en 1898, Rothberger⁵⁾ a introduit dans le pratique l'agar au neutralrot ou toluylenrot, une substance colorante du groupe de l'eurhodine, pour la différenciation du *Bact. coli* du *Bact. typhi*. Tandis que dans ce milieu, la première bactérie donne un éclaircissement de la couleur et une fluorescence, la seconde, ne le modifié pas, comme ne

¹⁾ Ann. de l'instit. Pasteur. 1905. p. 259.

²⁾ Traedwell, Chemie analytique. Paris (Trad. Goscinnny). T. I. 1910. p. 319.

³⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904. p. 120.

⁴⁾ Celli, A., Manuale dell'uffic. sanit. Roma 1899. p. 320.

⁵⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 24. 1898. p. 513.

le modifient pas *B. pyocyaneum*, *B. pneumoniae*, *B. rhinoscleromatis*, *V. cholerae*, *V. Deneckei*, *V. Metchnikowi* et *C. diphtheriae*. Dans un travail successif, Rothberger¹⁾ constatait le fait, que dans ce milieu de culture, *B. tetani*, *B. Chauveaudi* et *B. oedematis maligni*, se comportaient comme *B. coli*.

En 1900, Scheffler²⁾ perfectionne le milieu de Rothberger en y ajoutant du glycose, et il peut avec ce milieu, obtenir la réaction même par piqûre, avec de très petites quantités de matériel. Expérimentant, avec de nombreuses souches de *B. coli*, Scheffler constate que dans la réaction au neutralrot et au glycose, la fluorescence apparaît en 24 et au plus tard en 48 heures, mais que cette même fluorescence peut être déterminée par des bactéries de l'eau et des matières fécales n'ayant rien à faire avec *B. coli*.

Oldekop³⁾, préoccupé d'obtenir la réaction le plus vite possible, essaye de perfectionner l'agar de Rothberger et Scheffler. Or ayant constaté que la réaction apparaît d'autant plus vite, moins il y a d'agar dans la composition du milieu de culture, il a proposé de préparer l'agar au neutralrot de la façon suivante:

Dissoudre à chaud 5 gr. d'extrait de viande de Liebig, 2,5 gr. de chlorure de sodium et 10 gr. de peptone sèche de Witte dans 500 cc d'eau distillée; alcaliniser légèrement avec une solution de carbonate de soude, cuire une heure et filtrer. Au liquide filtré, on ajoute 0,3 % d'agar et on cuit 1 h. dans l'appareil de Koch; on filtre à chaud et on y ajoute 1 % d'une solution aqueuse concentrée de neutralrot et 0,15 % de glycose.

On verse cet agar dans des tubes qu'on stérilise 1½—2 h. dans l'appareil de Koch. Oldekop dit avoir pu garder ce milieu toujours actif jusqu'à dessiccation, et même la réaction lui a semblé plus nette dans le milieu ancien que dans celui récemment préparé. Nos expériences nous ont démontré que ce milieu peut se conserver très bien pendant une année, surtout si on le garde dans l'obscurité et que la quantité d'agar peut être portée à 0,6—0,8 %.

En 1911, Rochaix et Dufourt⁴⁾ reprennent l'étude de la question et font une constatation très intéressante: Dans les modifications observées dans le milieu au neutralrot sous l'influence de certaines bactéries, il faut distinguer 2 cas: 1. La simple fluorescence. 2. La coloration jaune-canari du milieu. Or tandis que la première s'observe avec différentes bactéries, telles que *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. enteritidis*, *B. paratyphi*, *B. pyocyaneum*, la coloration jaune canari ne s'observe qu'avec *B. coli* et avec les bactéries de la fermentation ammoniacale. Rochaix et Dufourt constatent donc, que lorsque la réaction jaune-canari apparaît, on peut affirmer que l'eau examinée est souillée par l'urine de l'homme, par du purin ou des matières fécales.

Dans une série de recherches de laboratoire, nous avons pu confirmer complètement les observations de Rochaix et Dufourt, soit en expérimentant à la température de 18° à 20° soit à celle de 37°. Dans le second cas, la réaction apparaît de 18—24 h. plus vite. Voici résumé dans

¹⁾ Ibid. Abt. I. Bd. 25. 1899. p. 15 und 69.

²⁾ Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 28. 1900. p. 199.

³⁾ Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904. p. 120.

⁴⁾ Journ. de physiol. et de pathol. génér. 1911. p. 67.

un tableau les résultats que nous avons obtenu en expérimentant avec différentes bactéries¹⁾.

Bactéries	Fluorescence	Coloration jaune-canari	Obser- vations
<i>C. diphtheriae</i> (a)	—	—	culture ana- érobie
<i>C. diphtheriae</i> (b)	—	—	
<i>B. oedematis maligni</i> . .	+	+	
<i>B. subtilis</i> (a)	—	—	Bulles de gaz " " " faible " "
<i>B. subtilis</i> (b)	+	—	
<i>B. anthracis</i>	—	—	
<i>B. coli</i> (a)	+	+	
<i>B. coli</i> (h)	+	+	
<i>B. paratyphi</i> B.	+	+	
<i>B. paratyphi</i> A.	+	+	
<i>B. typhimurium</i>	+	+	
<i>B. acidilactici</i>	+	+	
<i>B. enteritidis</i>	—	—	
<i>B. faecalis alocaligenes</i> .	—	—	
<i>B. typhi</i>	—	—	
<i>B. pneumoniae</i>	—	—	
<i>B. rhinoscleromatis</i> . . .	—	—	
<i>B. vulgare</i>	+	—	
<i>B. fluorescens</i>	+	—	
<i>B. pyocyaneum</i>	+	—	
<i>M. pyogenes aureus</i> . . .	—	—	
<i>M. melitensis</i>	—	—	

Des ensemencements faits avec des urines ou des matières fécales, telles quelles, ou diluées dans l'eau, nous ont montré la fluorescence et la coloration jaune-canari. Jamais nous n'avons obtenu de coloration jaune-canari avec des eaux potables pures.

De nos expériences il résulte donc, qu'en dehors d'une seule bactérie, *B. oedematis maligni*, il n'y a que des bactéries du groupe colityphique qui donnent fluorescence et coloration jaune-canari, tandis que la simple fluorescence peut être donnée par d'autres bactéries.

En outre, de l'eau souillée par de l'urine et des matières fécales, donne aussi fluorescence et coloration jaune-canari. Ces constatations faites au laboratoire avec les trois méthodes de Trillat et Turchet, de Griess et de Rothberger, nous avons pensé les appliquer à des eaux potables de profondeur, de surface et météoriques pour nous assurer de l'applicabilité de ces méthodes à la campagne et de leur utilité pratique.

Pour faciliter et simplifier l'application de ces procédés à l'étude des eaux à la campagne, nous avons procédé comme suit:

Les réactifs pour la recherche de l'ammoniaque et de nitrites, étaient placés dans de petits flacons plats de la capacité de 15 cc, flacons compte-gouttes. Les réactions étaient pratiquées dans des éprouvettes en verre dont une partie des parois était émaillée en blanc, éprouvettes qui permettaient d'apercevoir beaucoup mieux que dans des éprouvettes ordinaires, la coloration brune ou rouge.

¹⁾ Dans le tableaux le signe + indique réaction positive, le signe — réaction négative.

L'agar au neutralrot était introduit dans des éprouvettes de 11 cm de long et d'un diamètre de 9 mm et incliné. Ces éprouvettes, très résistantes et très faciles à transporter, nous ont semblé être les plus pratiques pour ces recherches. Les prises d'eau, soit pour l'analyse chimique, soit pour l'analyse bactériologique, ont été presque toujours faites directement, avec les éprouvettes tenues entre les doigts (fontaines) ou dans une pince de Cornet (eau de source, de surface, de citerne).

Dans certains cas, (citernes) nous avons prélevé l'eau avec un petit et lourd godet en cuivre étamé de 7 cm de diamètre pourvu d'un petit bec, et qu'on stérilisait en le flambant avec de l'alcool. Pour les prélèvements, le godet était suspendu à une ficelle. Inutile de dire que pour des recherches sur des eaux à des profondeurs variables, on doit se servir des appareils ordinairement employés (Es march, Czaplewski etc.) pour les prises d'eau. Notre but n'ayant été que de vérifier l'applicabilité de cette méthode à la campagne, nous ne nous sommes pas occupés de prises d'eau à différentes profondeurs. Dans certains cas, nous avonsensemencé les éprouvettes d'agar au neutralrot en prenant l'eau avec une cuiller de platine flambée de la capacité de 0,1 cc. C'est approximativement cette quantité d'eau que nous avons toujoursensemencée. Ayant constaté dans les expériences de laboratoire que la fluorescence et la coloration jaune-canari s'observant soit à la température de l'étuve, soit à celle de la chambre, et comme au point de vue pratique n'ayant pas à disposition des étuves, c'est cette dernière température qu'on doit utiliser; nous avons placé presque toutes nos éprouvettes à la température de la chambre (18°—20°). Quand la réaction s'est vérifiée, elle a été presque toujours très nette dans l'espace de 24—48 à 72 h.

Au cours des années 1911 et 1912, nous avons contrôlé par ce procédé 87 eaux prises dans des villes, à la campagne et à la montagne, jusqu'à une altitude de 2000 mètres.

Les 87 échantillons examinés peuvent se répartir comme suit:

32 eaux de profondeur, dont 13 prises à la source, 17 à des fontaines, et 2 dans des puits. 22 eaux de surface, dont 12 prises directement et 10 à des fontaines. 33 eaux météoriques, prises dans des citernes.

Tandis que dans presque toutes ces eaux, nous avons constaté par ensemencement sur agar au neutralrot la fluorescence, qui n'est pas un indice de souillure de l'eau, nous n'avons constaté la fluorescence accompagnée de la coloration jaune-canari et la formation de gaz, que dans un certain nombre de cas, associées ou non à la réaction de l'ammoniaque et des nitrites.

Sur les 32 eaux de profondeur examinées, nous avons observé la coloration jaune-canari dans 12 cas, et plus précisément: dans 7 prises aux fontaines, dans 3 prises aux sources elles-mêmes et dans 2 prises dans des puits. Sur ces 12 eaux, il n'y en a que 2 qui ont donné en même temps la réaction de l'ammoniaque et des nitrites et 2 qui n'ont donné que celle des nitrites.

Sur les 22 eaux de surface examinées, nous avons obtenu la réaction jaune-canari dans 13 cas et plus précisément dans 7 eaux prises directement et dans 6 prises aux fontaines. Sur ces 13 cas, il n'y en a que 3 qui ont donné en même temps la réaction de l'ammoniaque et des nitrites et une qui n'a donné que celle des nitrites.

Sur les 33 eaux météoriques (citernes) examinées, nous avons obtenu la réaction jaune-canari dans 10 cas et dans ces 10 eaux, il n'y en a pas eu une seule qui ait donné la réaction de l'ammoniaque et des nitrites.

Or toutes les eaux qui on donné la coloration jaune-canari de l'agar au neutralrot, étaient bien des eaux qui se présentaient suspectes déjà à l'examen des conditions locales, soit par le fait qu'elles étaient dans le voisinage de fumiers ou de matières excrémenticielles du bétail déposées sur leurs bords, ou bien parce qu'on y lavait des objets sales, ou qu'elles recevaient des écoulements d'égouts ou de cabinets; soit par le fait qu'on y avait trempé des ustensiles ayant traîné dans les chalets. Nous citerons entre autres quelques cas intéressants:

Un jour, nous avons pris de l'eau en même temps à une source de montagne située à 1900 m. environ, et au ruisseau qui en provenait. Ce ruisseau passait à côté d'un chalet et son eau était utilisée pour la boisson. Tandis que l'eau prise à la source n'a pas donné de coloration jaune-canari, celle prise au ruisseau l'a donnée très nette. Or sur les bords du ruisseau étaient répandues des matières excrémenticielles de bovidés. Dans un autre cas, une eau de profondeur prise à une fontaine du Jura, n'a pas donné de réaction jaune-canari le 19. V. 12. et nous l'a donnée très forte le 24. VI. 12, c'est à dire 25 ou 26 jours après qu'un chalet placé un peu plus haut fut habité. A la deuxième prise du reste, cette eau sentait le purin et nous en avons isolé *B. coli*.

Deux eaux condamnées par des analyses précédentes comme chargées de *B. coli*, ont donné les deux très nettement la réaction jaune-canari. Une source placée dans un terrain sablonneux et marneux, au dessous d'un canal d'irrigation d'eau d'égout, a donné très nette la réaction jaune-canari. L'analyse de cette eau donnait du reste: Résidu sec: 567,5 mgr pour mille; Résidu calciné: 503 mgr. Alcalinité: 325 mgr. Matières organiques: 44,2 mgr. Ammoniaque: 0,4 mgr. Chlorures 32,5 mgr. Acide nitreux: présence. Nitrates: présence. Sulfates: présence et présence de *B. coli*.

Une source de montagne, sur les bords de laquelle il y avait des excréments de bovidés a donné une très belle réaction jaune-canari; de même des citernes dans le voisinage des quelles il y avait des fumiers, et des ruisseaux de plaine ou de montagne, recevant des matières excrémenticielles, ou dans lesquelles on lavait des linges sales.

Dans plusieurs cas, nous avons essayé d'isoler *B. coli* des tubes ayant présenté la coloration jaune-canari et nous y avons toujours réussi.

Dans toutes les circonstances où l'inspection locale montrait de bonnes installations et de captages bien faits, et aussi l'éloignement des habitations des écuries et des fumiers, la réaction jaune-canari a toujours fait défaut.

De toutes ces recherches faites au laboratoire et à la campagne, nous non croyons autorisés à conclure: que le procédé de l'agar au neutralrot, préparé suivant la formule d'Oldenkop, est vivement à recommander pour le contrôle rapide des eaux potables. Il est plus sûr et même supérieur aux procédés chimiques de Trillat et Turchet et de Griess pour la recherche de l'ammoniaque et des nitrites, car la réaction jaune-canari peut être observée même quand ces deux réactions font défaut; surtout dans des cas d'infection récente de l'eau par des bactéries des matières fécales et des urines.

La technique que nous avons suivie, au moyen des petits tubes contenant l'agar au neutralrot incliné, nous semble surtout à recommander pour trois raisons: 1. La facilité du transport. 2. La facilité d'ensemencement. 3. Par le fait qu'on n'y introduit qu'une petite quantité d'eau (0,1 cc), de sorte

que l'apparition de la réaction nous renseigne même sur un degré assez élevé d'infection des eaux.

Nous n'hésitons donc pas à souscrire aux conclusions auxquelles est arrivé, tout en employant une technique différente de la nôtre, A. C o n o r¹⁾ dans un travail sur le contrôle des eaux potables des postes militaires du sud tunisien, travail paru au commencement de cette année:

"C'est un procédé qui permet une appréciation, au moins approximative, sur la valeur d'une eau d'alimentation." Pour tous ceux qui savent l'importance d'une pareille appréciation pour des armées en manoeuvre ou en campagne, un procédé qui nous permet d'une façon assez rapide une appréciation pareille est vivement à recommander.

Résumé.

L'agar au neutralrot préparé suivant la formule d'Oldekop et employé incliné dans de petites éprouvettes, est vivement à recommander pour le contrôle rapide des eaux de boisson.

L'apparition de la fluorescence accompagnée d'une coloration jaune-canari et souvent de la formation de gaz, peut nous permettre de considérer cette eau comme suspecte d'être infectée par des bactéries des fermentations ammoniacales (urines) et surtout par *B. coli*.

Cas échéant, on peut y associer la recherche de l'ammoniaque par le procédé de Trillat et Turchet et des nitrites par le procédé de Griess, qui pourtant donnent des résultats moins sûrs que ceux donnés par l'agar au neutralrot.

Lausanne, 30 octobre 1912.

Nachdruck verboten.

Eine Methode zur kontinuierlichen Reinzucht von Mikroorganismen.

[Mitteilung aus dem Institute für Molkereiwesen und landwirtschaftliche Bakteriologie der k. k. Hochschule für Bodenkultur in Wien.

Vorstand Prof. Dr. W. Winkler.]

Von Dr. Viktor Brudny,

Assistent am Institut.

Mit 1 Tafel und 1 Fig. im Text.

In allen jenen Fällen, wo es sich darum handelt, Reinkulturen von Mikroorganismen auf der Höhe ihrer Wirksamkeit zu erhalten, bleibt kein anderer Weg übrig, als eine kleine Menge der im Absterben begriffenen Mikroorganismen aus dem verbrauchten wieder in frisches Nährmaterial zu übertragen. Wo nicht gerade eine Passage durch den Tierkörper nötig ist, geschah diese Übertragung bisher mit Hilfe einer ausgeglühten Platinöse (sterilen Pipette) von der geimpften Eprouvete in eine zweite mit sterilem Nährmaterial. Abgesehen davon, daß diese Methode eine große Zahl von Epruvetten erfordert, ist auch bei sorgfältiger Arbeit die Gefahr einer Infektion mit fremden

¹⁾ Ann. de l'Inst. Pasteur de Tunis. 1912. p. 68.

Keimen während des Impfens nicht ganz ausgeschlossen. Die Verwendung eines Impfkastens hilft allerdings den zweiten, nicht aber den ersten Nachteil beseitigen.

Bei der Konstruktion eines Apparates, der die Übertragung von Mikroorganismen aus dem geimpften Nährboden in den sterilisierten — ohne Hinzutreten nicht sterilisierter Außenluft — ermöglichen sollte, mußte von vornherein darauf Rücksicht genommen werden, daß die in Betracht kommenden Mikroorganismen, die regelmäßig in bakteriologischen Laboratorien fortgezüchtet werden und praktische Verwendung gefunden haben (Reinkulturen von Hefen für Brauerei, Spiritusbrennerei, Weinbereitung, Reinkulturen von Milchsäurebakterien für Rahmsäuerung, Sauermilchbereitung, Schnittesäuerung, Reinkulturen von Essigsäurebakterien, Reinkulturen von Hefen und Bakterien für die Käseerei, Reinkulturen von Bodenbakterien, Reinkulturen von pathogenen Mikroorganismen usw.), nicht alle das gleiche Temperaturoptimum haben. Soweit sie sich in flüssigen Nährmedien züchten lassen — was ja bei der Mehrzahl derselben der Fall ist — und ein hohes Temperaturoptimum haben, können sie in nachfolgend beschriebenem Apparat vielleicht hundertmal hintereinander mit neuer Nährlösung versehen werden, ohne daß eine Öffnung des Apparates notwendig ist. Wenn die Übertragung in die frische Nährlösung alle drei Tage erfolgt, und nicht mehr als 10 ccm Nährlösung verwendet werden, würde man diesen Apparat nur einmal im Jahre mit frischer Nährlösung zu füllen brauchen.

Der Apparat besteht aus drei Teilen: Aus einer doppelhalsigen Flasche aus gut gekühltem Glase zur Aufnahme der sterilen Nährlösung (A), aus einem Kulturgefäße (B), in welchem die Vermehrung der betreffenden Mikroorganismen bei einer beliebigen Temperatur erfolgen kann, und aus einem Sammelgefäße (C) für die aus dem Kulturgefäße entfernte, verbrauchte Nährlösung mit den betreffenden Mikroorganismen. (Die Flasche A ist mit Gummistöpseln verschlossen, die nach dem Sterilisieren der Flasche mit einem Paraffinüberzug versehen werden.)

Das Übertreiben der Nährflüssigkeit von A nach B und von B nach C geschieht durch Luftdruck, ähnlich wie bei einer Spritzflasche. Vor ihrem Eintritte in die Kulturgefäße A und B passiert die Luft zuerst zwei kleine, mit Sublimat 1 : 1000 gefüllte Aufsätze (a, b) und wird dadurch sofort steril. Um das Übertreiben der Nährflüssigkeit von A nach B fein genug regulieren zu können, wird die Luft durch den Aufsatz a, bzw. den daran befestigten Gummischlauch, mit dem Mund hineingeblasen. Die Entfernung des genügend angereicherten Bakterienmaterials aus B geschieht dagegen durch Betätigung einer kleinen an b angebrachten Metallpumpe k. Da nach dem Hineinblasen in dem Aufsätze a ein kleiner Überdruck entsteht, so ist das in das Sublimat führende Röhrchen r_1 mit einer entsprechend großen Erweiterung zur Aufnahme des Sublimats versehen. Der Aufsatz b besitzt außer dem Röhrchen für den Lufttritt (r_2) auch ein solches für den Luftaustritt (r_3), welches in seiner kugelförmigen Erweiterung mit steriler Watte gefüllt und oben mit einer Gummikappe verschlossen werden kann. Will man die sterile Nährflüssigkeit von A nach B übertreiben, dann wird die Gummikappe entfernt und die Luft in A durch Hineinblasen komprimiert. Beim Übertreiben der bakterienhaltigen Flüssigkeit von B nach C wird die Gummikappe wieder aufgesetzt und die Luft in b durch die Pumpe k komprimiert. Die dadurch in C verdrängte Luft tritt durch das in der Glashülse h befindliche

Sublimat wieder ins Freie. (Das durch Verdunstung verloren gegangene Sublimat in *h* muß von Zeit zu Zeit ersetzt werden, am besten bei der Überimpfung, also vielleicht jeden 2. oder 3. Tag.)

Es erübrigt nur mehr, die Sterilisierung und Zusammensetzung des Apparates, die Beschickung mit Impfmateriel, die Temperierung des Kulturgefäßes *B* und die Entnahme von Impfmateriel zu besprechen.

Wie aus der Zeichnung ersichtlich ist, kann das Gefäß *A* zusammen mit dem Gefäß *B* aus der Fassung *F*₁ und dem Temperierbade *T* herausgehoben werden. Das in der Fassung *F*₂ zurückbleibende Sammelgefäß *C* kann nun mit einem Wattestopfen verschlossen und für sich sterilisiert werden. Die Sterilisierung der Gefäße *A* und *B* erfolgt in einem entsprechend großen Autoklaven in der Weise, daß man zuerst *A* mit dem Aufsatz *a* und dem halboffenen Einfülltrichter *Tr* versieht, dann die Pumpe *k* entfernt und die Öffnungen der Röhren *r*₁ und *r*₂ mit kleinen Wattestopfen verschließt. Ebenso wird auch die Glocke *g* mit Watte verschlossen.

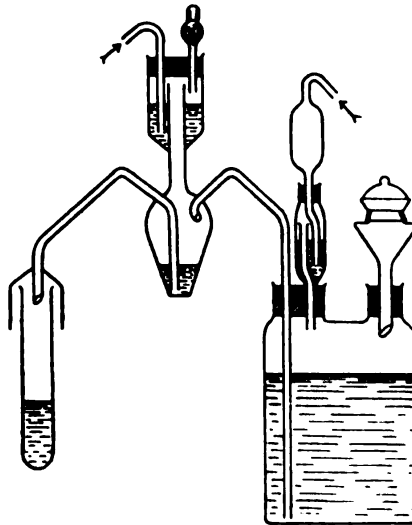
Nach erfolgter Sterilisation werden der Wattestopfen des Sammelgefäßes *C* und der der Glocke *g* entfernt. Die Verbindung der Teile *A*, *B* und *C* erfolgt dann durch Einschieben der Glocke *g* zwischen den Hals von *C* und die darauf mit einem Gummiringe befestigte Glashülse *h*. Nachdem dieser Raum zum Schutze gegen das Eindringen fremder Keime mit Sublimat 1 : 1000 gefüllt worden ist, werden auch die Aufsätze *a* und *b* zur Hälfte mit Sublimat von derselben Konzentration gefüllt. Ist der Einfülltrichter geschlossen worden und sind die Röhren *r*₁ und *r*₂ — nach Entfernung der Wattestopfen — mit der Pumpe bzw. dem Gummischlauche verbunden worden, dann ist der Apparat zur Aufnahme der sterilen Nährlösung und des Impfmateriels bereit.

Das Einfüllen der in gewöhnlichen Rund- oder *Erlenmeyer* kolben von 1—1½ l Inhalt sterilisierten Nährlösung geschieht durch den Einfülltrichter *Tr*. Während des Einfüllens kann derselbe mit einer seitlich aufgeschnittenen mit Alkohol ausgespülten Glasglocke *Gl* überdeckt werden. Nach dem Einfüllen wird der äußere Rand des Einfülltrichters mit einer Dichtungsmasse (gleiche Teile von Vaseline und Wachs) bestrichen und hierauf der passend zugeschliffene sterile Deckel aufgesetzt.

Die Einführung des Impfmateriels geschieht, nach vorsichtiger Entfernung des Gummistopfens von *b*, mittels einer feinen und langen, sterilen Pipette durch das Röhren *i*. Handelt es sich um sehr luftbedürftige Mikroorganismen, dann muß die Gummikappe des Röhrens *r*₃ immer entfernt bleiben und nur für die Zeit des Übertreibens der Kulturflüssigkeit von *B* nach *C* aufgesetzt werden.

Je nach dem Temperaturoptimum und der dabei auftretenden Wachstumsgeschwindigkeit der in *B* geimpften Mikroorganismen ist es nun nötig, das Kulturgefäß *B* eine gewisse Zeit lang bei einer bestimmten höheren Temperatur zu halten und in der übrigen Zeit wieder auf Zimmertemperatur oder eine niedrigere Temperatur einzustellen. Diesem Zwecke dient das zylindrische, kupferne Temperierbad *T*, das mit Wasser von der gewünschten Temperatur gefüllt und durch den Mikrobrenner *m* auf dieser Temperatur erhalten werden kann. Zum Schutze gegen Wärmeausstrahlung ist es von einem nach unten offenen Mantel *M* umgeben, nach oben ist es durch einen in zwei Hälften teilbaren Deckel *D* verschlossen. In einem Tubus des Deckels ist das Thermometer *t* angebracht. Die genaue Einstellung auf die gewünschte Temperatur geschieht durch vertikale Verschiebung des Mikrobrenners am

Stativ und durch Regulierung der Flammenhöhe. Es hat sich im Verlaufe der Versuche gezeigt, daß die Einstellung auf die gewünschte Temperatur leicht in wenigen Minuten erfolgt und daß sich die einmal eingestellte Temperatur beliebig lange nahezu konstant erhalten läßt — ebenso konstant wie beim Gebrauche von Thermoregulatoren. Die vor jeder Überimpfung nötige Füllung des Temperierbades mit Wasser von der gewünschten Temperatur geschieht durch die Hähne z_1 und z_2 , eventuell kann durch dieselben — nach Verlöschung des Mikrobrenners — ein konstanter Strom von Wasser oder Eiswasser durchgeleitet werden. Um die Höhe der Flüssigkeit im Kulturgefäße B einstellen zu können, — man muß darauf achten, daß der Flüssigkeitsspiegel mit der Ausflußöffnung der aus A kommenden Röhre nicht in Berührung kommt — besitzt das Temperierbad T vorn und rückwärts je einen Tubus mit einem Schauglase (Sch).



Skizze, die Entnahme von Impfmateri-
al aus dem Reinzuchtapparat nach Dr.
Brudny zeigend.

Die Entnahme von Impfmateri- al geschieht aus der Glocke g. Die zu diesem Zwecke nötige Senkung des Sammelgefäßes C kann dadurch erreicht werden, daß die auf das Stativ nur lose aufgelegte Blechscheibe, welche C trägt, einfach weggeschoben wird. Unter die Glocke g wird dann der zu impfende Kolben (Eprouvette) mit der betreffenden Nährlösung gehalten. Obenstehende schematische Zeichnung zeigt diese einfache Manipulation.

Nach der Fertigstellung des ersten Apparates wurde derselbe im Laboratorium für Molkereiwesen und landwirtschaftliche Bakteriologie an der k. k. Hochschule für Bodenkultur in Wien in Gebrauch genommen. Zuerst wurden die Glasteile sterilisiert und das Gefäß A mit steriler Milch beschickt. In das Kulturgefäß B kam eine Reinkultur von Milchsäurebakterien, wie sie zur Herstellung von bulgarischer Sauermilch (Yoghurt) benützt wird. Bekanntlich finden sich in der echten bulgarischen Sauermilch 3 Arten von Milchsäurebakterien: ein Langstäbchen (*B. bulgaricus*), ein Milchsäurestreptococcus und ein Doppelkurzstäbchen. Wie zahlreiche, über ein Jahr lang fortgesetzte Versuche des Verfassers in dem erwähnten Institute gezeigt haben, begegnet die Fortzüchtung des *B. bulgaricus* auf Agar oft Schwierigkeiten.

Infolge seines hohen Temperaturoptimums (42° C) geht er in kurzer Zeit bei Zimmertemperatur zugrunde. Wenn die Überimpfung der Reinkultur in größeren Zeitintervallen erfolgt, dann tritt die Gerinnung einer mit der Reinkultur geimpften sterilen Milch immer viel später ein, als wenn die Überimpfung in kürzeren Zeitintervallen erfolgt. Am besten wächst der *B. bulgaricus* in sterilisierter Milch. Um normale, nicht degenerierte Formen des *B. bulgaricus* zu erhalten, muß man eine Reinkultur desselben in eine Epruvette mit steriler Milch übertragen, dieselbe bei 42° C bis zur Gerinnung der Milch halten und von dieser Epruvette nach einigen Tagen wieder etwas auf eine neue Epruvette mit steriler Milch übertragen usw. Denselben Vorgang muß man auch bei Fortzüchtung des Gemisches von Bakterien verfolgen, welches zur Herstellung von Yoghurt verwendet wird.

Es hat sich nun nach mehrmonatlichen Versuchen herausgestellt, daß der Apparat zur Fortzüchtung des erwähnten Fermentes vorzüglich geeignet ist. Die Einstellung auf die Temperatur von 42° C erfolgte rasch und genau, das Bakteriengemisch, das jeden zweiten Tag mit neuem Nährmaterial versehen wurde, erwies sich, trotz wiederholter Entnahme von Impfmateriel, frei von jeder Verunreinigung, die Bakterien zeigten immer normale, lebenskräftige Formen und — was das Wichtigste ist — der prozentische Anteil einer Bakterienart am Gemisch blieb immer derselbe. Natürlich wurde die Flüssigkeit aus dem Kulturgefäße B noch vor Eintritt der Gerinnung entfernt. Weitere Versuche mit anderen Bakterienarten und flüssigen Nährböden sollen zeigen, ob auch bei längerer Versuchsdauer (1 Jahr, eventuell mehrere Jahre) ebenso günstige Resultate erzielt werden. Es wäre zu wünschen, daß diese Prüfung auch an anderen Instituten erfolgen würde.

Der Apparat ist von der Firma Franz Hegershoff in Leipzig in einwandfreier Ausführung zu beziehen und wurde von dieser Firma auch mit Muster-schutz versehen.

Tafelerklärung.

Apparat zur kontinuierlichen Reinzucht von Mikroorganismen nach Dr. Viktor Brudny ($\frac{1}{4}$ nat. Größe).

Nachdruck verboten.

Eine Methode zur Darstellung der Struktur fertiger Bakterien-sporen, nebst Bemerkungen über das Reifen derselben.

Von Prof. Dr. Vladislav Růžicka,

Vorstand des Labor. für allg. Biologie und exper. Morphologie der böhm. Universität in Prag.

Mit 1 Tafel.

Bekanntlich haben bereits einige Autoren über das Vorhandensein eines Chromatinkornes in Bakterien-sporen berichtet, welches sie insgesamt als Sporenkern gedeutet haben.

Diese Deutung ist vielfach angezweifelt worden und zwar aus mehreren Gründen.

Zweite Abt. Bd. 36.

37

Der schwerwiegendste Grund war der, daß es mit Hilfe der bis heute verwendeten Methoden noch niemandem gelungen ist, das fragliche Chromatinkorn auch in der völlig reifen Spore nachzuweisen. Dagegen gelingt es, wenn auch nicht ohne Schwierigkeiten, welche die Auffindung des geeigneten Entwicklungsstadiums bereitet, so doch mit Hilfe der üblichen Fixations- und Tinktionsverfahren das beschriebene Chromatinkorn in den Spätstadien der reifenden und auch in den Frühstadien der keimenden Spore zur Darstellung zu bringen.

Die Auffindung desselben in der völlig reifen Spore wäre jedoch von eminenter allgemein-biologischer Wichtigkeit, denn, wie ich in mehreren Abhandlungen dargelegt habe, so hängt die Lösung der Frage der allgemein-biologischen Bedeutung der morphologischen Struktur des Bakterienprotoplasten durchaus nur davon ab, wie sich die Frage der Entstehung seines Chromatins entscheiden wird¹⁾. Ließe sich die Chromatinkontinuität bis in die völlig reife Spore hin verfolgen und würde man in der letzteren das so vielfach postulierte, bis jetzt aber noch von niemandem festgestellte Chromatinkorn nachweisen können, so könnte der Schluß naheliegen, daß man der Auffassung des Bakterienprotoplasten als Zelle wohl kaum entraten wird. Freilich müßte der Beweis geliefert werden, daß das Chromatinkorn dem Kerne entspreche. Sollte sich dagegen ergeben, daß in der Spore die Kontinuität des Chromatins unterbrochen ist, so würde dies für die Einfügung der Bakterien in das allgemein gebräuchliche Zellschema ein wohl unüberschreitbares Hindernis bilden.

Die Wissenschaft beruht auf Wissen. Das Wissen aber — der Tatsachenschatz — jeder Epoche kann nicht über die Leistungsfähigkeit der derselben zur Verfügung stehenden Methoden hinausreichen. Den wirklichen Fortschritt der Wissenschaft kann nur die Vervollkommnung der Untersuchungsmethoden gewährleisten.

Obschon ich — wie aus meinen früheren Arbeiten über das vorliegende Thema bekannt sein dürfte — auf Grund des vorliegenden Tatsachenmaterials, das auf Grund der bisher bekannt gewordenen Methoden gesammelt worden war, der ursprünglich von Bütschli geäußerten Ansicht, daß die Bakterien den Zellkernen analog gebaut sind, zugeneigt habe, so habe ich trotzdem eben auf das Studium der Bakteriensporen meine Aufmerksamkeit gerichtet, in der Hoffnung, ob es trotz allem nicht doch gelingen würde, in das Geheimnis ihrer Struktur einzudringen.

Jahrelange physiologisch-chemische Versuche über die Entstehung des Chromatins in der keimenden Spore haben mich, entgegen den Resultaten der mit Hilfe bekannter Methoden ausgeführten morphologischen Untersuchungen, immer mehr dahin gedrängt, das Chromatin in der Spore als etwas bereits Gegebenes, nicht aber als etwas erst durch die Keimungsprozesse selbst Entstehendes anzusehen²⁾.

Und so habe ich mich schon lange abgemüht, das Chromatin in der nach allgemeiner Auffassung völlig reifen Spore zur Darstellung zu bringen.

Die Unsichtbarkeit des postulierten „Kernes“ in der völlig reifen Spore wurde bekanntlich in verschiedener Weise erklärt. Die einen meinten, daß

¹⁾ Centralbl. f. Bakter. Abt. II. Bd. 23. 1909.

²⁾ Die zu diesen Versuchen benützten Sporen wurden aus höchstens einige Monate alten Kulturen gewonnen.

das Chromatin während der Reifungsprozesse der Spore vollständig schwinde. Diese Ansicht war sehr gut gestützt durch die folgenden Tatsachen. Erstens ist es zweifellos, daß während der Reifung das Chromatin, welches ursprünglich die ganze Sporenanlage erfüllt, tatsächlich schwindet. Es bleibt schließlich nur ein Chromatinkorn, der vermeintliche „Kern“, übrig und das war bislang in der sog. völlig reifen Spore auch nicht mehr nachzuweisen.

Es war zu eruieren, ob auch dieses Korn wirklich schwindet. Bekanntermaßen haben manche die Unsichtbarkeit derselben in der reifen Spore damit zu begründen gesucht, daß es entweder durch das kondensierte und mit Reservestoffen gefüllte Sporenplasma verdeckt oder aber daß seine Tingibilität durch die starke Sporenmembran beeinträchtigt werde.

Die letztere Meinung ist leicht zu widerlegen. Denn die Unfärbbarkeit der reifen Spore ist bloß relativ; bei protrahierter Färbung (16 und mehr Stunden) dringt die Farbstofflösung selbst ohne Anwendung besonderer Hilfsmittel in die Spore ein und färbt ihren Inhalt diffus. Außerdem wäre, falls die Dicke der Membran ein Hindernis bilden sollte für wässrige Lösungen, die Assimilationsfähigkeit der Sporen auf Nährsubstraten in Frage gestellt. Die tägliche Praxis bringt jeden mit Bakterien arbeitenden Forscher sehr bald zu der Überzeugung, daß die Keimung der Sporen nicht von einem besonderen Durchlässigwerden ihrer Membran, sondern nur von der chemischen Reaktionsfähigkeit (mit anderen Worten: Assimilierbarkeit) des Substrates zusammenhängt. Man züchtet ja die Bakterien vielfach auf festen, nicht verflüssigenden Substraten; Voraussetzung der Assimilation, die nur durch Diffusionsvorgänge vor sich gehen kann, ist: Durchgängigkeit der Membran. Die chemische Reaktionsfähigkeit des Substrates führt zur Ausscheidung von Fermenten, welche die Nährsubstanzen in diffusable Lösung bringen.

Außerdem kann vielfach beobachtet werden, daß die dicke Sporenmembran während des Alterns der Sporen allmählich schwindet, so daß die Spore schließlich nur von einer Plasmahaut umgeben ist. Bei der Keimung wandeln sich solche Sporen direkt in die vegetativen Individuen um, ohne irgendwelche Membranreste zu hinterlassen.

Die Behauptung also, daß die Dicke der Sporenmembran die Färbung des in der Spore vorausgesetzten eingeschlossenen Chromatingebildes behindert, erscheint bei näherer Analyse kaum haltbar.

Es bliebe somit noch der Einwand, daß eine Färbung zwar möglich, doch durch das verdichtete und außerdem mit Reservestoffen gefüllte und daher stark lichtbrechende Sporenplasma verdeckt werde.

Die Ansicht, daß die Spore dem kondensierten Protoplasten entspreche, entstammt einer früheren Zeit. Heute wissen wir, daß es sich weniger um eine Kondensation, als um eine chemische Umwandlung des ursprünglich chromophilen Plasmas der Sporenanlage in ein plastinartiges der reifen Spore handelt. Hierbei kommt es zwar — falls sich die von mir geäußerte, nach dem jetzigen Standpunkte wohl begründete Vermutung, daß das Plastin den Albuminoiden verwandt sei, als richtig herausstellen sollte — auch zu einer Kondensation, indem die Albuminoide viel komplexere Verbindungen sind, als die Nukleoproteide, wofür ja auch ihre Resistenzreaktionen und ihr biologisches Verhalten sprechen¹⁾. Sonst wäre ja auch der Verbrauch an

¹⁾ Siehe diesbezüglich meine Arbeiten: Zur Kenntnis der Natur und Bedeutung des Plastins. (Arch. f. Zellforsch. I. 1908.) Das Chromatin und Plastin in ihren Beziehungen zur Regsamkeit des Stoffwechsels. (Festschr. f. Hertwig I. 1910.)

Reservestoffen, der bei der Bildung der Spore nachgewiesenermaßen vor sich geht, unerklärlich, da es sich ja dabei nach allgemeiner Ansicht um Ausbildung eines ruhenden Gebildes, das doch viel einfacher durch bloße Retraktion des Plasmas und nachfolgende Encystierung zustande kommen würde, handelt. Darnach ist die Kondensation bei der Sporenbildung chemischen Charakters. Aber diese Kondensation verhindert in keinem Objekte, in welchem man ähnlichen Gebilden begegnet, die Färbung von Chromatinpartikeln, falls solche überhaupt vorhanden sind.

Es müßte sonach scheinbar nur auf die Behauptung rekurriert werden, daß die „Sporenkerne“ durch die in der Spore angehäuften Reservestoffe verdeckt werden. Die Reservestoffe, welche in den sporulierenden Individuen gespeichert erscheinen, als Fett, Glykogen und Volutin, werden nach Meyer bei der Sporenbildung verbraucht. Die einzige bis jetzt vorliegende chemische Analyse der Sporen von D y r m o n t und N e n c k i hat gleichfalls nur unbedeutende Spuren von Fett und öligen Stoffen ergeben. Die fertigen Sporen sollen aber nach Meyer keinen der genannten Reservestoffe enthalten, sondern es sind „vielleicht in den Sporen nur Eiweißstoffe als Reservestoffe gespeichert“¹⁾. Zur Begründung, daß es sich um Reservestoffe handelt, greift Meyer zu Analogien, indem er anführt, daß die meisten pflanzlichen Eiweißstoffe Reservestoffe sind und meint, daß auch die Nukleoproteide oder das „Nuklein“ nicht als ein dem Zellkernprotoplasma eingefügter Stoff betrachtet werden dürfen: in den Samen seien alle diese Eiweißkörper als Reservestoffe enthalten. Nur ca. 5 Proz. der normalen Trockensubstanz der Pflanzenzelle entsprächen dem eigentlichen Protoplasma. Solche Analogien sind natürlich in keiner Weise beweisend.

Bei Meyers weitgefaßter Auffassung des Begriffs „Reservestoff“ müßte man nahezu sämtliche Eiweißkomponenten des Organismus als Reservestoffe ansehen und zwar um so mehr, als gezeigt worden ist, daß während protrahierter Hungerversuche alle Bestandteile des Organismus mit Ausnahme der embryonalsten eingeschmolzen werden können (B a r f u r t h). Trotzdem wird niemand bezweifeln, daß eine solche Behauptung unberechtigt wäre.

Es lassen sich auch gewichtige Argumente gegen die Behauptung aufbringen, daß die Bakteriensporen überhaupt eine größere Menge von Reservestoffen enthalten.

Es ist nämlich vor allem nicht abzusehen, warum sich dieselben in den Sporen ablagern sollten, nachdem ja die letzteren völlig ruhende Gebilde darstellen sollen.

Man kann nämlich Sporen viele Jahre lang unter solchen Verhältnissen halten, daß sie keine Nahrung aufzunehmen vermögen, z. B. auf Glassplitttern. Sollten die vermuteten Reservestoffe etwa dazu dienen, um der Spore unter solchen Verhältnissen das Leben zu fristen helfen, so müßten sie allmählich abnehmen und es würde dann also vielleicht in solchen alten Sporen mit Hilfe der üblichen Methoden leichter gelingen, das vorausgesetzte Chromatingebilde sichtbar zu machen. Ich habe zwei und drei Jahre alte Sporen des *Bact. anthracis* untersuchen können, ohne in dieser Beziehung einen Erfolg einzuheimsen.

Aus diesem Versuche kann übrigens auch geschlossen werden, daß die reifen Sporen keine Atmung besitzen. Wenn eine äußere oder intramole-

¹⁾ Die Zelle der Bakterien p. 238.

kulare Atmung vorhanden wäre, so müßte sich die Spore allmählich verzehren und die Keimfähigkeit müßte bald erlöschen.

Ich habe fernerhin zahlreiche Versuche unternommen, um die Sporen durch künstliche Entwicklungserregung zum Keimen auf Substraten zu bringen, welche keine Nahrungsstoffe enthielten. Wiewohl ich im KOH ein Mittel kennen gelernt habe, von dem geschlossen werden kann, daß es imstande ist, die künstliche Entwicklungserregung bei gewissen Sporen herbeizuführen, so ist mir dieser Versuch doch niemals in einem von Nährstoffen ganz freien Substrat gelungen.

Es kann, soweit meine bisherigen Erfahrungen reichen, als feststehend betrachtet werden, daß die Sporen nur auf einem ihnen adäquaten Nährsubstrate zur Entwicklung gelangen. Wenn sie Reservestoffe in was für immer Form enthielten, müßten sie auch in destilliertem oder im abgekochten gewöhnlichen Wasser auskeimen.

Man könnte nämlich meinen, daß alte auf indifferentem Material (Glas, Holz, Papier) aufbewahrte Sporen nur aus Mangel an dem notwendigen Wasser die in ihnen enthaltenen Reservestoffe nicht assimilieren können.

Die Sporenmembran selbst ist ja für Wasser durchlässig; dies wird dadurch bewiesen, daß die Spore in Wasserlösungen von Nährstoffen auskeimt, und daß sie mit Wasserlösungen von Farbstoffen direkt färbbar ist (siehe, was darüber oben erwähnt wurde). Selbst Fischer¹⁾, der die Ansicht verteidigt hat, daß die Sporenhaut undurchlässig ist, spricht sich dahin aus, daß durch längeres Verweilen im Wasser diese Undurchlässigkeit überwunden wird. Wir wissen zwar, daß die Sporen schon binnen 1—3 Stunden auskeimen, wenn sie nur auf ein ihnen entsprechendes Substrat gesetzt werden. Aber beachten wir diese Erfahrung nicht und erfüllen wir nur das Postulat Fischers! Man brauchte also, um die Durchgängigkeit der Membran für Wasser zu erzielen, die Sporen bloß für einige Zeit in das Wasser zu bringen. Wenn sie wirklich Reservestoffe enthalten, so wären dann alle Bedingungen erfüllt, die zum Auskeimen notwendig sind — genügende Sauerstoffzufuhr und Temperatur vorausgesetzt.

Ich habe viele derart arrangierte Versuche angestellt und zwar unter anderen auch mit Sporen von im Wasser vorkommenden Bakterienarten, als *B. mykoides*, *radicosus*, *megatherium*. Ich möchte nur einen solchen Versuch anführen und zwar mit *B. mykoides*. Sporenfäden wurden eingebracht in

steril., dest. od. gewöhl. Wasser,	dest. Wasser u. Pepton,	dest. Wasser u. KOH ²⁾
28./5. —	—	—
29./5. —	Wachstum	—
30./5. —	„	—

sämtlich gehalten bei 37° C.

Weder im destillierten oder gewöhnlichen Wasser allein, noch im destillierten Wasser mit KOH als entwicklungserregendem Mittel waren die Sporen angegangen; einzig und allein im destillierten Wasser mit Pepton war der Erfolg positiv. Die Identifizierung des daselbst zur Keimung gelangten Kulturmateri als geschah durch das Plattenverfahren. Alle nach dieser Richtung hin auch mit anderen Bakterien von mir unternommenen Versuche haben zu dem gleichen Ergebnis geführt.

¹⁾ Vorlesungen über Bakterien. Jena (Fischer) 1903. p. 40.

²⁾ Schwach, aber doch deutlich alkalisch.

Ich halte daher die Ansicht, daß die Bakteriensporen Reservestoffe in beträchtlicherer Menge enthalten, für nicht genügend begründet und glaube sie darauf zurückführen zu können, daß die Sporen hauptsächlich aus eiweißhaltigem Protoplasma bestehen, das meiner Meinung nach den Albuminoiden nahe steht. Reservestoffe können demnach für die Darstellung des Chromatins in der reifen Spore wohl kaum ein Hindernis bieten.

Nun aber stehen wir vor dem Dilemma: deuten auf der einen Seite so manche Hinweise (insbesondere meine vorn erwähnten Versuche über den Ursprung des Chromatins in keimenden Sporen) auf die Gegenwart des Chromatins in der Spore hin und bieten auf der anderen weder die Membran, noch die Reservestoffe, noch der allgemeine Charakter der die Spore zusammensetzenden Substanz ein Hindernis für die Darstellung desselben — warum vermag man mit den bisherigen Hilfsmitteln diese Darstellung nicht zu erzwingen?

Man könnte diese Frage mit Aufstellung einiger Vermutungen beantworten. Ich will indes statt solcher eine Methode mitteilen, welche es nunmehr endlich gestattet, das Chromatin der sog. völlig reifen Spore zur Darstellung zu bringen und durch eine Analyse dieser Methode die Grundlagen zur Beantwortung der obigen Frage schaffen.

Die von mir benützte Methode ist sehr einfach. Die mit der Platinnadel abgehobene Kulturprobe wird in einem ganz kleinen Tröpfchen Wasser auf dem Objektglase verrieben und ausgebreitet. Die dünne Schicht läßt man an der Luft austrocknen. Sodann tropft man auf die trockene Schicht 25-proz. Salpetersäure, die man 4 Minuten einwirken läßt. Die Säure wird mit fließendem destilliertem Wasser gut ausgewaschen. Es folgt die Färbung mit einer Mischung von 1 Teil konz. alkoholischer Fuchsinlösung mit 10 Teilen destill. Wassers, die 2 Minuten währt. Darauf Abspülung mit Wasser, in welchem auch untersucht wird. Es kann jedoch auch nach vorherigem Austrocknen in Kanadabalsam eingeschlossen werden.

Ein Blick auf die nebenstehende Tafel orientiert über den Erfolg und die Brauchbarkeit der Methode.

Uns kommt es nun vor allem darauf an, die Wirkungsweise dieser Methode klarzulegen.

Wir haben bereits erwähnt, daß die Membran der Spore für wässrige Lösungen durchgängig sein muß. Am besten wird dies dadurch bewiesen, daß sich die Spore diffus durchfärbt, wenn man sie in kalten Lösungen von basischen Anilinfarben längere Zeit liegen läßt. Nachdem in meiner Methode die Färbung in kurzer Zeit vollendet wird, so könnte man die Meinung hegen, daß die in derselben benutzte Salpetersäure die Durchlässigkeit der Membran erhöht. Dies könnte dadurch bewirkt werden, daß die Salpetersäure etwa irgendwelche Bestandteile der Membran auflösen würde.

Wenn dies aber zutreffen würde, so wäre nicht einzusehen, warum der nunmehr leichter eindringende Farbstoff nicht die ganze Spore durchfärbt, wie dies bei protrahierter Färbung ohne jegliche Vorbehandlung der Fall ist. Es müßte daher wohl noch weiterhin angenommen werden, daß die Salpetersäure aus dem eiweißhaltigen Sporenhalte Stoffe entfernt, welche die Färbung sonst behindern. Das kann freilich nicht ausgeschlossen werden, obschon auch die Bedeutung dieser Annahme durch Hinweise auf mehrere Umstände entkräftet werden könnte.

Denn — benützt man statt der Salpetersäure Alkalien, die doch in hohem Maße eiweiß- und membranlösend wirken, so bleibt der in der Tafel dargestellte Erfolg der Färbung völlig aus¹⁾. Außerdem färbt sich ja, wie schon erwähnt wurde, der gesamte Inhalt der Spore durch die bloße Farblösung, wenn nur die Wirkung der letzteren verlängert wird.

Bei dieser Sachlage bleibt also wohl nur noch eine einzige Möglichkeit zu erwägen: nämlich die, daß die Salpetersäure im Sinne der Ehrlich'schen Ausführungen als unechte Beize wirkend, die Acidität des Chromatinkornes der Spore so weit erhöht, daß eine Spaltung des basischen Fuchsin bewirkt und die Verkettung seiner färbenden Base an der sauren Substanz des Chromatinkornes und somit auch die Entstehung des die Färbung des letzteren zustande bringenden Farbsalzes ermöglicht wird.

Das würde freilich voraussetzen, daß sich die Acidität der das Chromatinkorn zusammensetzenden Substanz im Laufe des Sporenalters vermindert, und es fragt sich, ob für eine solche Annahme irgendwelche direkte Stützen aufgebracht werden könnten.

Eine direkte Stütze müßte darin erblickt werden, wenn es gelingen würde, das Chromatinkorn ohne irgendwelche voraufgegangene Vorbehandlung mit einem sauren Farbstoffe zu färben.

Ich habe zu solchen Versuchen vor allem das Wasserblau gewählt. Das Wasserblau ist ein ausgesprochen saurer Farbstoff, (siehe P o p p e n R e i n e Farbchemie S. 353); es liefert mit dem basischen Fuchsin einen Niederschlag. Dasselbe wird durch Sulphonation des basischen Anilinblaus gewonnen, enthält also neben sauren auch basische Gruppen, so daß es an die Grenze der sauren und basischen Farbstoffe zu stehen kommt. Infolgedessen eignet sich das Wasserblau in ganz hervorragender Weise zur Färbung von Körpern, die an der Grenze der Basis- und Oxyphilie stehen.

Färbt man nun mit einer 1-proz. wässrigen Lösung des Wasserblaus bloß physikalisch fixierte²⁾ reife Sporen, so ist der Effekt gleich Null. Verstärkt man die Acidität des Substrates durch Vorbehandlung mit Salpetersäure und färbt sodann mit Wasserblau, so ist der Erfolg wiederum negativ. Dieses Resultat ist keineswegs überraschend und wird verständlich, wenn man die chemische Zusammensetzung dieses Farbstoffes in Betracht zieht. Es muß geschlossen werden, daß seine sauren Gruppen ein solches Übergewicht über die basischen besitzen, daß selbst eine Verstärkung der Acidität des Substrates nicht hinreicht, um die basischen Gruppen des Wasserblaus abzuspalten und zu binden. Daß diese Ansicht richtig ist, kann durch den nachfolgenden Versuch bewiesen werden. Setzt man dem sauren Farbstoffe eine Säure zu, so wird dadurch nach P a p p e n h e i m (Farbchemie) seine Färbekraft verstärkt. Färbt man nun physikalisch fixierte Sporen mit durch Essigsäure angesäuertem Wasserblau³⁾, so erhält man das Chromatin derselben tatsächlich gefärbt.

Es erklärt sich somit sowohl die Färbung des Sporenchromatins mit dem basischen Fuchsin nach vorangegangener Behandlung mit Salpetersäure, als die Färbung desselben mit dem angesäuerten sauren Wasserblau

¹⁾ Man darf natürlich die Alkalien nicht länger einwirken lassen, als die Salpetersäure, da sonst die Gefahr besteht, daß das Sporen-Chromatin durch dieselben aufgelöst werden könnte.

²⁾ Um die natürliche Chromatophilie hervortreten zu lassen.

³⁾ Auf 10 ccm einer 1%-wässrigen Lösung 15 Tropfen Acid. acet. glac.

ohne Vorbehandlung durch die Wirkung der in beiden Fällen als unechte Beize mitwirkenden Säure.

In dem ersten Falle mußte die Azidität des Substrates erhöht werden¹⁾; dasselbe ist also wenig sauer, in höherem Maße basisch. In dem zweiten Falle mußte die Wirkung der sauren Gruppen des Farbstoffes erhöht werden; das Substrat ist also vielmehr basisch, als sauer.

Eine weitere direkte Stütze für die Behauptung, daß sich die Azidität des Chromatinkornes der Spore allmählich vermindert, muß in den Unterschieden seines Färbungsvermögens erblickt werden. Bekanntlich kann dasselbe während der Reifung der Spore mit dem basischen Fuchsin aus gewöhnlicher Wasserlösung ohne jede Vor- und Nachbehandlung direkt gefärbt werden; darüber liegen mehrfache Angaben vor. In der alten, völlig reifen Spore kann man es aber, wie ich soeben gezeigt habe, nur nach Vorbehandlung mit Säure zur Darstellung bringen.

Ich glaube daher, mit Recht schließen zu dürfen, daß die Azidität der Substanz des Sporenchromatins im Laufe des Alterns abnimmt.

Es fragt sich nun, welche Bedeutung diesem Vorgange zukommt.

Da allgemein angenommen wird, daß der saure Charakter der Chromatingebilde durch ihren Gehalt an Nuklein- (resp. Phosphor-)säure bedingt wird, so müßte aus der oben erwiesenen Abnahme der Azidität geschlossen werden, daß sich der Gehalt des Chromatinkornes der Spore an Nukleinsäure während des Alterns vermindert.

Das Altern der Spore ist somit mit gewichtigen chemischen Umwandlungen ihres Chromatins verbunden.

Durch die eben geschilderten Vorgänge wird man beim Studium des Sporenchromatins unwillkürlich an die Befunde von Israel und Pappenheim an reifenden Erythrocyten erinnert, nach welchen der Schwund des Erythroblastenkernes während der Reifung zum Erythrocyten mit einer solchen Umwandlung seines Basichromatins verbunden ist, durch welche dasselbe dem Oxychromatin verwandelt wird.

In der reifen Spore gehen analoge Veränderungen von statten. Verändert sich aber das ursprüngliche Basichromatin der Sporenanlage in einer Weise, daß es seines charakteristischen Bestandteiles — der Nukleinsäure — verlustig wird, so wird dadurch wohl eben auch seine Funktion als Äquivalent der Kernsubstanz fraglich, indem das Nukleoproteid — dessen spezifische Eigenschaften eben von denjenigen der Nukleinsäure abzuleiten sind — ja das Charakteristische der Kernsubstanz bildet.

Ein Kern ohne Chromatin (im Sinne des Nukleoproteids aufgefaßt) könnte nach dem derzeitigen Stande unserer Kenntnisse unmöglich die für den Kern charakteristischen Funktionen ausüben. Dies dürfte auch ohne weitere Darlegungen klar sein. Und klar tritt es besonders bei der alten Spore in den Vordergrund, die ja ein völlig ruhendes Gebilde darstellt. In Übereinstimmung mit diesem letzteren Umstande sehen wir eben das Basichromatin der Spore schwinden. An einem anderen Orte²⁾ habe ich auf

¹⁾ Daß dies tatsächlich der Fall ist, wird durch das Verhalten der vegetativen Individuen bewiesen; diese erscheinen nämlich in den nach meiner Angabe behandelten Präparaten auffallend überfärbt.

²⁾ Das Chromatin und Platin in ihren Beziehungen zur Regsamkeit des Stoffwechsels. (Festschr. f. Rich. Hertwig I. 1910. Jena [Fischer].)

die direkte Abhängigkeit des Basichromatins von der Reife der Stoffwechselvorgänge hingewiesen. Im Sinne dieser Ausführungen wäre das Vorhandensein des Chromatins in den sog. völlig ausgereiften Sporen als ein Zeichen aufzufassen, daß in den letzteren noch immer irgendwelche Stoffwechselvorgänge bestehen.

Sollte man aber Stoffumsetzungen in der ruhenden Spore annehmen, so würde die Spore vor allem kein ruhendes Gebilde sein, für das man sie doch bislang nicht ohne Grund angesehen hat; es würde weiterhin nicht nur unbegreiflich sein, warum sie sich nicht gänzlich verzehrt, wenn ihr jede Stoffzufuhr von außen verwehrt ist; es würden schließlich auch die oben zitierten Resultate meiner Versuche über die Keimfähigkeit der Sporen im Wasser unverständlich sein.

Das Problem läßt sich indes vielleicht anders fassen.

Man hat bisher der Meinung gehuldigt, daß die Auslöschung der direkten Färbbarkeit der Spore den Augenblick ihrer Reife und zugleich das Aufhören ihrer Stoffwechselprozesse bezeichnet.

Meine in der vorliegenden Publikation berichteten Befunde würden jedoch vielleicht die Deutung zulassen, daß man den Augenblick der Reife auf einen späteren Zeitpunkt im Leben der Spore verschieben müßte — auf denjenigen nämlich, in welchem das Chromatin aus der Spore völlig geschwunden wäre.

Diese Deutung hängt jedoch von der Beantwortung der nachstehenden Frage ab.

Es entsteht nämlich die Frage, ob wir angesichts des von mir mitgeteilten Befundes von Chromatingebilden in nach derzeitigem Ermessen völlig reifen Sporen, noch irgendwelche Anhaltspunkte besitzen, um auf einen völligen Schwund des Chromatins in der Spore überhaupt schließen zu dürfen.

Da möchte ich nun vor allem darauf hinweisen, daß sich schon frühzeitig in sporulierenden Kulturen mancher Bakterien Sporen auffinden lassen, in welchen man mit Hilfe meines obzitierten Verfahrens zwar ein Körperchen nachweisen kann, das jedoch sehr blaß ist und keinen Farbstoff annimmt. (Siehe Tafel 1 B. anthracis letzte, B. mycoides neunte, B. megatherium fünfte Spore.) Außerdem aber findet man weiterhin Sporen, in denen auch mit Hilfe meiner Methode überhaupt keine Spur eines wie immer gestalteten Innengebildes nachgewiesen werden kann. (Auf Tafel 1 B. anthracis 5., B. subtilis 3. B. mycoides 6. und 7. Spore.) Die Zahl der letzteren kann freilich nicht als beträchtlich bezeichnet werden¹⁾, doch müßte man noch ältere Kulturen untersuchen, als es mir bis jetzt möglich war. Desgleichen bleibt erst zu erwarten, ob sich chromatinfreie Sporen bei allen sporenbildenden Bakterien nachweisen lassen. Schließlich wäre es notwendig, den Zeitpunkt festzustellen, in welchem das Chromatin aus der Spore verschwindet, was mir bis jetzt infolge Mangels an älterem Sporenmaterial nicht möglich war. Bezüglich dieser Fragen scheint mir jedoch der nachstehende Befund von Wichtigkeit.

¹⁾ Bei B. mycoides scheinen sie jedoch ziemlich zahlreich zu sein.

Ich hatte nämlich Gelegenheit, 20 Jahre altes Sporenmaterial (Eiter von Tetanus zu untersuchen¹⁾). Auch die in diesem Materiale ziemlich zahlreich vorhandenen Sporen des Tetanusbacillus wiesen bei Behandlung mit meiner Methode keine Spur eines Chromatingebildes auf. Die meisten nahmen keine Färbung an; nur einzelne zeigten eine leichte diffuse Färbung (siehe Tafel 1).

Es kommt nun bei der Beurteilung dieses Befundes darauf an, ob diese alten Sporen noch keimfähig, also noch lebensfähig waren. Denn die Chromatinlosigkeit abgestorbener Sporen dürfte kaum auffallend sein.

Um dies zu entscheiden, habe ich den auf Papier in einem Probierröhrchen steril aufbewahrten Eiter in drei Portionen geteilt. Die eine wurde nach Einweichung in Wasser und Zerpulverung behufs mikroskopischer Untersuchung nach meiner Angabe behandelt, die andere — wenn auch mit geringen Hoffnungen auf Erfolg — zu einem Tierversuche verwendet. In tiefer Chloroformnarkose²⁾ wurde sie einer weißen Ratte unter die Haut gebracht. Die dritte wurde schließlich auf den Boden einer Eprouvette gebracht, mit Zuckeragar hoch überschichtet und bei 37° im Thermostaten gehalten.

Schon glaubte ich ein negatives Resultat verzeichnen zu müssen, als — fast wider alle Erwartung — nach Ablauf einer Woche bei der geimpften, völlig isoliert verwahrten Ratte die typischen Symptome des Tetanus auftraten, die am nächsten (9.) Tage mit dem Tode endeten.

Die im Eiter der Inokulationsstelle vorfindlichen sehr zahlreichen Sporen zeigten das in der Tafel 1 dargestellte Verhalten frischer Tetanus-sporen.

Hiermit war also der Beweis geliefert, daß die zum Versuche verwendeten chromatinlosen Sporen nicht nur keimfähig, sondern in jeder Beziehung lebenskräftig waren³⁾.

Die Chromatinlosigkeit derselben kann daher nicht mit dem Absterben der Sporen erklärt werden. Im Gegenteile muß, da die frischen Sporen im Eiter des Versuchstieres das Chromatin wieder enthalten haben, aus meinem Versuche geschlossen werden, daß das Vorhandensein des Chromatins in der Spore mit dem manifesten Leben derselben in irgendwelcher Weise zusammenhängt, also wohl mit Stoffwechselvorgängen, wie ich ja auch schon früher (l. c.) behauptet habe.

Angesichts der Tatsache, daß es mir gelungen ist, die ganze Kette der Übergänge vom direkt mit basischem Farbstoff färbbaren Chromatinkorn zu oxychromatischen, weiterhin zu unfärbbaren blassen Gebilden innerhalb der Sporen und schließlich zu den alten chromatinlosen Sporen nachzuweisen, dürften nunmehr wohl auch die letzten Zweifel schwinden, daß die völlig reifen, alten, stoffwechsellosen Sporen wirklich kein Chromatin enthalten. Diese Zweifel waren ohnehin nur theoretischer und hypothetischer Natur, da ja erst durch die vorliegende Publikation die Darstellungsmöglichkeit dieses Chromatins auf einem bestimmten Lebensstadium der Spore bekannt geworden ist. Wer

¹⁾ Dasselbe wurde mir durch die Freundlichkeit des H. Prof. Dr. Velich aus dessen Institut für landwirtschaftl. Bakteriologie an der böhmischen technischen Hochschule in Prag zur Verfügung gestellt.

²⁾ Um die natürliche Resistenz des Tieres herabzusetzen (Methode von Velich).

³⁾ Der oben erwähnte Kultivationsversuch hatte ein negatives Resultat gezeitigt, das jedoch in Anbetracht des positiven Erfolges des Tierversuches nicht in die Wag-schale fällt.

meine Behauptung widerlegen wollte, müßte das Chromatin in solchen alten Sporen erst nachweisen.

Was nun die Deutung des von mir in der fertigen Spore dargestellten Gebildes¹⁾ anlangt, so könnte an zweierlei Eventualitäten gedacht werden. Man könnte es entweder als Kernsubstanz (ev. Centriole im Sinne Hartmanns) oder als Reservestoff ansehen.

Diese Fragen möchte ich indes hier nicht entscheiden. Ihre Lösung hängt auch mit einer detaillierten Darstellung der Umwandlungen des Chromatinsgebildes in der fertigen Spore zusammen, die ich mir für eine spätere Publikation vorbehalten muß.

¹⁾ Die Auffindung desselben erklärt die Schlußfolgerung, die ich aus meinen eingangs erwähnten Versuchen über die Entstehung des Chromatins in der keimenden Spore gezogen habe und die zum Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchung geworden ist. Diese wäre wohl kaum unternommen worden, wenn ich zu jenen Versuchen sehr alte, chromatinfreie Sporen hätte verwenden können.

Berichtigung.

Im Artikel von Müller-Thurgau und A. Osterwalder, „Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen“, Bd. 36. No. 6/14, 1912 muß es heißen:

Seite 164	Zeile 22	von unten:	Fehling statt Fühling
„ 200	„ 17	„ oben:	von statt viel
„ 206	„ 8	„ unten:	angriff statt angriffen
„ 206	„ 6	„ „	keinen statt einen
„ 225	„ 6	„ oben:	mußte statt daher
„ 227	„ 17	„ unten:	7,95 statt 9,95
„ 286	„ 27	„ oben:	dauernden Versuche statt dauernde Versuchen
„ 303	„ 13	„ unten ist das Wort	„durch“ zu streichen
„ 314	„ 6	„ oben ist das Wort	„um“ zu streichen.

Neue Literatur,

zusammengestellt von

Prof. Dr. OTTO HAMANN,

Oberbibliothekar der Kgl. Bibliothek in Berlin.

Allgemeines, Lehrbücher usw.

Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Gärungs-Organismen und Enzymen. Unter Mitwirkung v. Fachgenossen bearb. u. hrsg. v. Alfred Koch. Jg. 20. 1909. Leipzig (Hirzel) 1912. VIII, 660 p. 8°. 26 M

Untersuchungsmethoden, Instrumente usw.

Friedberger, E., Über einen neuen, keimdichten Verschluss für Zentrifugenröhrchen und Kulturgefäße. (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig. Bd. 14. 1912. H. 6. p. 637—639. 2 Fig.)

Systematik, Morphologie.

- Arnaud, G.**, Sur la cytologie des Capnodium meridionale et des mycélium du Fumagines. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 155. 1912. No. 16. p. 726—728. 1 Fig.)
- Bainier, G.**, et **Sartory, A.**, Etude d'une espèce nouvelle de Pestalozzia. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1912. No. 5. p. 433—436. 1 Taf.)
- Bresadola, J.**, Polyporaceae Javanicae. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1912. No. 5. p. 492—508.)
- Chittenden, F. H.**, The broad-nosed Grain Weevil. The long-headed flour beetle. (Papers on insects affecting stored products; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin 96. p. 2. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 19—28. 8°.)
- The lesser Grain-borer. The larger grain-borer. (Papers on insects affecting stored products; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin 96. P. 3. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 29—52. 8°.)
- Notes on various truck-crop insects. (Some Insects injurious to truck crops; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin 82. P. 7. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 85—93. 8°.)
- The Fig Moth. Report on the fig moth in Smyrna by E. G. Smyth. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. No. 104. Washington. Gov. Print. Off. 1911. 65 p. 8°.)
- The southern Beet Webworm. (Papers on insects affecting vegetables; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 109. P. 2. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 17—22. 8°.)
- and **Marsh, H. O.**, The imported Cabbage Webworm. (Papers on insects affecting vegetables; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 109. P. 3. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. p. 23—45. 8°.)
- Cushman, R. A.**, Notes on the peach and plum slug. (Papers on deciduous fruit insects and insecticides; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 97. P. 5. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 91—102. 8°.)
- Dale, Elizabeth**, On the fungi of the soil. 1. Sandy soil. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1912. No. 5. p. 452—477. 6 Taf.)
- Dean, W. Harper**, The Sorghum Midge. (Papers on cereal and forage insects; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 85. P. 4 [rev.] Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 39—58. 8°.)
- Diedicke, H.**, Die Gattung Septoria. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1912. No. 5. p. 478—487.)
- Dine, D. L. van**, The Sugar-cane Insects of Hawaii. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. No. 93. Washington. Gov. Print. Off. 1911. 54 p. 8°.)
- Douglas, S. R.**, und **Distaso, A.**, Über den Kern der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 66. 1912. Heft 5/6. p. 321—327. 1 Taf.)
- v. Höhnelt, Franz**, Fragmente zur Mykologie. 14. Mitt. No. 719—792. Wien (Hölder) 1912. 68 p. 8°. 2 Taf. 7. Fig. (aus: Sitzungsber. d. K. Akad. Wiss.) 2,65 M
- Hyslop, A.**, The false Wireworms of the Pacific Northwest. (Papers on cereal and forage insects; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin 95. P. 5. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. p. 73—87. 8°.)
- The Legume Pod Moth. The legume pod maggot. (Papers on cereal and forage insects; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 95. P. 6. Washington. Gov. Off. 1912. p. 89—108. 8°.)

- Kossowicz, A.**, Einführung in die Agrikulturmykologie. Teil 1: Bodenbakteriologie. Berlin 1912. 142 p. 47 Fig. 8°. 4 M
- Marlatt, C. L.**, The Mango weevil *Cryptorhynchus mangiferae* (Fabr.). Washington 1911. 3 p. 2 Fig. 8°. (Circ. Dep. Agr.) 0,50 M
- Marsh, H. O.**, The Hawaiian Beet Webworm. With app. by H. G. Dyar and F. H. Chittenden. (Papers on insects affecting vegetables; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 109. P. 1. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. 15 p. 8°.)
- Moulton, Dudley**, The California Peach Borer. (Papers on deciduous fruit insects and insecticides; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 97. P. 4. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 65—89. 8°.)
- Phillips, W. J.**, The Timothy Stem-borer, a new timothy insect. (Papers on cereal and forage insects; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 95. P. 1. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. 9 p. 8°.)
- Quaintance, A. L.**, and **Jenne, E. L.**, The Plum Curculio. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. No. 103. Washington. Gov. Print. Off. 1912. 250 p. 8°.)
- Quaintance, A. L.**, Notes on the peach bud mite. (Papers on deciduous fruit insects and insecticides; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 97. P. 6. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. p. 103—114. 8°.)
- Sydow, H.**, und **P.**, Beschreibungen neuer südafrikanischer Pilze. 2. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1290. No. 5. p. 437—444.)
- , *Mycotheca germanica*. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1912. No. 5. p. 445—451; Fasc. 22—23. No. 1051—1150.) mit Fig.
- Trotter, A.**, *Mycetum Tripolitanorum pugillus*. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1912. No. 5. p. 509—514.)
- Webster, F. M.**, Preliminary Report on the Alfalfa weevil. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. No. 112. Washington. Gov. Print. Off. 1912. 47 p. 8°.)
- , The Alfalfa weevil. (*Phytonomus murinus* Fabr. Washington [Circ. Dep. Agric.] 1911. 9 p. 8°. 10 Fig.) —, 50 M
- , The so-called 'Curlew Bug'. (Papers on cereal and forage insects; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 95. P. 4. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. p. 53—71. 8°.)
- Wildermuth, V. L.**, The Alfalfa caterpillar. (*Eurymus eurytheme* Boisd. Washington [Circ. Dep. Agric.] 1911. 14 p. 8 Fig. 8°.) —, 50 M
- Wolf, F. A.**, A new *Gnomonia* on Hickory Leaves. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1912. No. 5. p. 488—491. 1 Taf.)
- Zimmer, J. F.**, The Grape Scale. (Papers on deciduous fruit insects and insecticides; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 97. P. 7. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. p. 115—124. 8°.)

Biologie.

- Dietsch, P.**, Über die Abschleuderung der Sporidien bei den Uredineen. (Mycol. Centralbl. Bd. 1. 1912. Heft 2. p. 355—359.)
- Foster, S. W.**, Life History of the codling moth and its control on pears in California. (Papers on deciduous fruit insects and insecticides; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 97. P. 2. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 1351—. 8°.)
- Kalantarian, P.**, Bakteriologische Untersuchungen über Tschernosem. Leipzig 1911. 58 p. 10 Fig. 8°.
- Klein, J.**, Über die sogenannte Mutation und die Veränderlichkeit des Gärvermögens bei Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 73. 1912. Heft 1. p. 87—118.)
- Kossowicz, A.**, Die Zersetzung von Harnstoff, Harnsäure, Hippursäure und Glykol durch Schimmelpilze. 2. Mitt. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 2. 1912. Heft 1. p. 51—55.)
- und **v. Gröller, L.**, Rhodanverbindungen (Schwefelcyanverbindungen) als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelquelle für Schimmelpilze, Sproßpilze (Hefe) und Bakterien. 1. Mitt. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 2. 1912. Heft 1. p. 59—65.)
- und **Loew, W.**, Vorläufige Mitteilung über das Verhalten von Hefen und Schimmelpilzen zu Natriumthiosulfat. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 2. 1912. Heft 1. p. 78.)
- Kostytschew, S.**, Über Alkoholgärung. 1. Mitt. Über die Bildung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung. (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 79. 1912. p. 150—145.)
- und **Hübner, E.**, Über Alkoholgärung. 2. Mitt. Über Bildung von Äthylalkohol aus Acetaldehyd durch lebende und getötete Hefe. (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 79. 1912. p. 359—374.)
- Lasseur, A. P.**, Contribution à l'étude de *Bacillus chlororhaphis* G. et S. Nancy 1911. 149 p. 8°. 1 Taf.

- Snyder, T. E.**, Damage to chestnut telephone and telegraph poles by wood-boring insects. (Insects injurious to forests and forest products; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 94. P. 1. Washington. Gov. Pr. Off. 1910. 12 p. 8°.)
- Spieckermann, A.**, Beiträge zur Biologie der Fettzersetzung. (Festschr. d. med.-nat. Ges. Münster. 84. Vers. Deutscher Naturf. 1912. p. 94—111.)
- Thaysen, A. C.**, Funktionelle Anpassungen bei Bakterien. (Centralbl. f. Bakter. Abt. 1. Orig. Bd. 67. 1912. Heft 1/2. p. 1—36.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zur unbelebten Natur.

Luft, Wasser, Boden.

- Arnould, E.**, Le traitement des eaux de boissons par les hypochlorites alcalins. (Rev. d'hyg. T. 34. 1912. No. 10. p. 1030—1040.)
- Bassalik, K.**, Über Silikatzersehung durch Bodenbakterien. 1. Mitt. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 2. 1912. Heft 1. p. 1—32.)
- Cadeddu, F.**, Sugli anaerobi delle acque. (Giorn. d. Ph. Soc. Ital. d'igiene. Anno 34. 1912. No. 9. p. 393—403. 1 Fig.)
- Colin, G.**, Stérilisation des eaux potables. Thèse de Lyon 1912. 8°.
- Sirigo, G.**, Sui vibroni delle acque. (Giorn. d. Ph. Soc. Ital. d'igiene. Anno 34. 1912. No. 9. p. 404—415.)

Fleisch.

- Bitting, A. W.**, Preparation of the cod and other salt fish for the market; including a bacteriolog. study of the causes of reddening. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Chemistry. Bulletin. 133. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. 63 p. 8°.)

Milch, Molkerei.

- Martel, H.**, La production et le contrôle sanitaire du lait destiné aux Parisiens. (Ann. d'hyg. publ. et de méd. lég. Sér. 4. T. 18. 1912. p. 344—360.)
- Scholl, A.**, Über Yoghurt. (Festschr. d. med.-nat. Ges. Münster. 84. Vers. Deutscher Naturf. 1912. p. 112—122.)

Bier, Bierbereitung.

- Moufang, E.**, Ein Beitrag zur Verfärbung der Biere durch Hefe. (Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen Jg. 35. 1912. No. 48. p. 549—550.)
- Sautmann, H.**, Über den Nachweis von Biersarcina in der Hefe mittels der Würzekultur. (Die Brau- u. Malzindustrie Jg. 13. 1912. p. 207.)
- Schönfeld, F.**, Die letztjährigen Gersten und Hefen. (Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. Jg. 40. 1912. No. 49. p. 546—550.)
- Thausing, J. E.**, Hefe und Azidität des Bieres. (Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. Jg. 40. 1912. No. 49. p. 550—551.)
- Zikes, H.**, Ein Beitrag zur Enzyymbildung und deren Ursachen. (Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. Jg. 40. 1912. No. 49. p. 554—556.)

Wein, Weinbereitung.

- Deville, La** situation viticole en 1910. (Ann. de la Soc. d'agric. de Lyon 1911. Lyon 1912. p. 29—78.)

Andere Nahrungsmittel.

- Dunbar**, Über die Verwendung gesundheitsschädlicher Stoffe in der Margarinefabrikation. (Blätter f. Volksgesundheitspfl. Jg. 12. 1912. No. 2.)
- Kossowicz, A.**, Die Verwendung von Milchsäure und Milchsäurebakterien bei der Gürkensäuerung. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 2. 1912. Heft 1. p. 78—80.)

Wohnungen, Abfallstoffe, Desinfektion usw.

- Bertarelli, E.**, Il metodo Braun per la depurazione biologica delle acque luride. (Riv. di igiene e sanità pubbl. Anno 22. 1912. No. 21. p. 683—691. 6 Fig.)
- Kallert, E.**, Wanddesinfektion durch direktes Besprengen mit Formalinlösung. (Desinfektion Jg. 5. 1912. Heft 10. p. 295—321; Heft 11. p. 333—349 u. Diss. vet.-med. 1912. 8°.)
- Steimmig, R.**, Neues Verfahren zum Konservieren von Kartoffeln, Futterrüben, Grünmais und anderen Futtermaterialien. (Deutsche landw. Presse 1912. p. 685.)
- Thienemann, A.**, Aristoteles und die Abwasserbiologie. (Festschr. d. med.-nat. Ges. Münster. 84. Vers. Deutscher Naturf. 1912. p. 175—181.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zu Pflanzen.**Krankheitserregende Bakterien und Parasiten.**

- Andres, A.**, Über die den Baumwollpflanzen in Ägypten schädlichen Schmetterlinge. (Congrès internat. d'Entomol. Bruxelles 1910. Vol. 1. Mém. 1911. 1 Taf.)
- Billings, F. H.**, and **Glenn, P. A.**, Results of the artificial use of the white-fungus disease in Kansas: with notes on approved methods of fighting chinch bugs. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. No. 107. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. 58 p. 8°.)
- Bredemann, G.**, Über den Alkaloidgehalt des Mutterkorns auf englischem Raygras (*Lolium perenne*). (Mykol. Centralbl. Bd. 1. 1912. Heft 11. p. 359—364.)
- Brittlebank, C. C.**, Eruptive disease or exanthema of orange trees in Australia. (Journ. of the Dep. of agric. of Victoria Vol. 10. 1912. Part. 7. p. 401—404.)
- Chittenden, F. H.**, A List of insects affecting stored cereals. The Mexican grain beetle. The Siamese grain beetle. (Papers on insects affecting stored products; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 96. P. 1. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. 18 p. 8°.)
- Collinge, W. E.**, Manual of injurious Insects. Birmingham 1912. XX u. 268 p. 105 Fig. 8°. 12,80 M
- French, C., jun.**, A new pest to maize. (Journ. of the Dep. of agric. of Victoria Vol. 10. 1912. Part. 7. p. 450—451. 2 Fig.)
- , Destructive scale insects. (Journ. of the Dep. of agric. of Victoria Vol. 10. 1912. Part. 8. p. 485—486.) 4 Fig.
- Jones, P. R.**, and **Horton, J. R.**, The Orange Thrips: a report of progress for the years 1909 and 1910. (Papers on insects injurious to citrus and other subtropical fruits; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 99. P. 1. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. 16 p. 8°.)
- Marks, G.**, A Fungus affecting pastures in manning districts. (Agric. Gaz. of New South Wales Vol. 23. 1912. Part. 8. p. 682.)
- Morgan, A. C.**, Insect Enemies of Tobacco in the United States. Washington 1911. 18 p. 1 Taf. u. 12 Fig. 8°. (Yearb. Dep. Agr.)
- Morstatt, H.**, Eine neue Krankheit an Calotropis in Ost-Afrika. (Ann. Mycol. Vol. 10. 1912. No. 5. p. 451.)
- Pierce, W. D.**, assist. by **R. A. Cushman** and **C. E. Hood**, under the dir. of **W. D. Hunter**, The Insect Enemies of the cotton boll weevil. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. No. 100. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. 99 p. 8°.)
- Papers, and Jenne, E. L.**, On deciduous fruit insects and insecticides. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. No. 80. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. 167 p. 8°.)
- Phillips, E. F.**, and **White, G. F.**, Historical Notes on the causes of bee diseases. (U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. No. 98. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. 96 p. 8°.)
- Sasaki, C.**, New Aphis-gall on *Stryax japonicus*. (Congrès internat. d'Entomol. Bruxelles 1910. Vol. 1. Mém. 1911. 2 Taf.)
- Schwangart**, Wissenschaftliche Arbeiten über Rebenschädlinge (Schluß). (Mitt. d. Deutschen Weinbau-Ver. Jg. 7. 1912. No. 12. p. 409—411.)
- Theobald, F. V.**, The Apides on Mangolds and allide plants. (Journ. of the board of agric. Vol. 19. 1912. No. 6. p. 466—476. 2 Taf.)

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien und Parasiten.**Pflanzenschutz.**

- Adam, M.**, L'assurance contre la grêle. (Rev. de viticult. Année 19. 1912. No. 988. p. 589—591.)
- Chittenden, F. H.**, and **Popenoe, C. H.**, Carbon Tetrachlorid as a substitute for carbon bisulphid in fumigation against insects. (Papers on insects affecting stored products; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 96. P. 4. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 53—57. 8°.)
- F. K.**, Erfolge und Mißerfolge bei der Bekämpfung des Aescherichs (*Oidium Tuokeri*). (Allg. Wein-Ztg. Jg. 29. 1912. No. 43. p. 496—497.)
- Johnson, F.**, Vineyard Spraying Experiments against the rose-chaffer in the Lake Erie Valley. (Papers on deciduous fruit insects and insecticides; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 97. P. 3. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. p. 53—64. 8°.)

- , Spraying Experiments against the grape leafhopper in the Lake Erie Valley. (Papers on deciduous fruit insects and insecticides; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 97. P. 1. Washington. Gov. Pr. Off. 1911. 12 p. 8°.)
- , Spraying Experiments against the grape leafhopper in the lake Erie valley in 1911. (Papers on deciduous fruit insects and insecticides; U. S. Dep. of Agric. Bureau of Entomology. Bulletin. 116. P. 1. Washington. Gov. Pr. Off. 1912. 13 p. 8°.)
- Kober, F.**, Erfolgreiche Peronosporabekämpfung in den Weingärten der n.-ö. Landes-Wein- und Obstbauschule in Retz im Jahre 1912. (Allg. Wein-Ztg. Jg. 29. 1912. No. 46. p. 531.)
- MacLintock, C. T., Houghton, E. M., and Hamilton, H. C.**, A contribution to our Knowledge of insecticides. Proc. 7. internat. Zool.-Congr. Boston 1907. p. 613—628.
- Portele, K.**, Die Bekämpfung des Oidiums durch Kaliumpermanganat. (Allg. Wein-Ztg. Jg. 29. 1912. No. 43. p. 495—496.)
- Schwanhart**, La lutte contre les teignes de la vigne. (Rev. de viticult. Année 19. 1912. p. 525—529, 564—568.)

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

- Brudny, Viktor**, Eine Methode zur kontinuierlichen Reinzucht von Mikroorganismen, p. 573.
- Day, F. E., and Baker, Julian L.**, A Bacterium causing Ropiness in Beer, p. 433.
- Frieber, Walther**, Eine Modifikation der Untersuchungsmethode von Gärungsgasen, p. 438.
- Galli-Valerio, B., et Bornand, M.**, Le contrôle rapide des eaux potables par les cultures sur Agar au Neutralrot, p. 567.
- Garbowski, L.**, Keimungsversuche mit Konidien von *Phytophthora infestans* de Bary, p. 500.
- Hastings, E. G., Evans, Alice C., and Hart, E. B.**, The Bacteriology of Cheddar Cheese, p. 443.
- Hoffmann, Conrad**, The Protein and Phosphorus Content of *Azotobacter* Cells, p. 474.
- Honing, J. A.**, Über die Variabilität des *Bacillus solanacearum* Smith, p. 491.
- Omeliansky, W.**, Zur Frage der Zellulosegärung, p. 472.
- Ritter, Georg Albert**, Beiträge zur Kenntnis der niederen pflanzlichen Organismen, besonders der Bakterien, von Hoch- und Niedermoores in floristischer, morphologischer und physiologischer Beziehung, p. 490.
- Rosenblat-Lichtenstein, Stephanie, und Fringsheim, Hans**, Über ein aerobes Stickstoff assimilierendes *Clostridium*, p. 468.
- Růžicka, Vladislav**, Eine Methode zur Darstellung der Struktur fertiger Bakteriosporen, nebst Bemerkungen über das Reifen derselben, p. 577.
- Stewart, Robert**, The Intensity of Nitrification in Arid Soils, p. 477.
- von Tubenl, C.**, Mistel-Infektionen zur Klärung der Rassenfrage, p. 508.
- Voges, Ernst**, Über Regenerationsvorgänge nach Hagelschlagwunden an Holzgewächsen, p. 532.
- Wahl, Bruno**, Kleinere Mitteilungen über die Nonne und deren Feinde, p. 531.

Berichtigung, p. 587.

Neue Literatur. p. 588.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung **Gustav Fischer** in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 29. Januar 1913.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 36. No. 26.

Ausgegeben am 6. März 1913.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 36 enthaltenen Arbeiten.

- Arachovskij, V.**, Über die Methoden zur Gewinnung mikroorganismenfreier Samen (Orig.). 421
- Bachmann, Fritz**, Beitrag zur Kenntnis obligat anaerober Bakterien (Orig.). 1
- Baker, Julian, L. s. Day, F. E.** Berichtigung. 587
- Bornand, M. s. Galli-Valerio, B.**
- Brudny, Viktor**, Eine Methode zur kontinuierlichen Reinzucht von Mikroorganismen (Orig.). 573
- Buromsky, J.**, Die Salze Zn, Mg und Ca, K und Na und ihr Einfluß auf die Entwicklung von *Aspergillus niger* (Orig.). 54
- Day, F. E. and Baker, Julian, L.**, A Bacterium causing ropiness in beer. (Orig.) 433
- Evans, Alice, C. s. Hastings, E. G.**
- Faber, F. C. v.**, *Spirillum bataviae* n. sp. (Orig.). 41
- Feilitzen, Hjalmar v.**, Beiträge zur Kenntnis der niederen pflanzlichen Organismen, besonders der Bakterien von Hoch- und Niedermoores in floristischer, morphologischer und physiologischer Beziehung von Dr. Georg Albert Ritter. Kurze Berichtigung. (Orig.) 53
- Fischer, Hugo**, Vom Trocknen des Bodens (Orig.). 346
- Frieber, Walther**, Eine Modifikation der Untersuchungsmethode von Gärungsgasen (Orig.). 438
- Galli-Valerio, B. et Bornand, M.**, Le contrôle rapide des eaux potables par les cultures sur Agar au Neutralrot (Orig.). 567
- Garbowaki, L.**, Keimungsversuche mit Konidien von *Phytophthora infestans* de Bary (Orig.). 500
- Gorini, Costantino**, Studien über die rationelle Herstellung des Parmesan- (Grana-) Käses (Orig.). 42
- Hanzawa, Jun**, Notiz über Eierkonservierung in China (Orig.). 418
- Hart, E. B. s. Hastings, E. G.**
- Hastings, E. G., Evans, Alice, C. and Hart, E. B.**, The Bacteriology of Cheddar cheese (Orig.). 443
- Heikertinger, Franz**, Die einheimischen Kohlerdflöhe (Orig.). 98
- Hoffmann, Conrad**, The protein and phosphorus content of *Azotobacter* cells (Orig.). 474
- Honing, J. A.**, Über die Variabilität des *Bacillus solanacearum* Smith (Orig.). 491
- Kroulik, Alois**, Über thermophile Zellulosevergärer. Vorläufige Mitteilung (Orig.). 339
- Lipman, Chas. B.**, Antagonism between anions as affecting Ammonification in soils (Orig.). 382
- Molz, E.**, Richtigstellung der Entgegnung von Dr. Max Munk zu meinen Bemerkungen über dessen Arbeit: „Bedingungen der Hexenringbildung bei Schimmelpilzen“ (Orig.). 353
- Müller, Karl**, Zur Biologie der Schwarzfleckenkrankheit der Ahornbäume, hervorgerufen durch den Pilz *Rhytisma acerinum* (Orig.). 67
- Müller, Thurgau und Osterwalder, A.**, Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen (Orig.). 129
- Münter, F.**, Über Actinomyceten des Bodens. I. Mitteilung (Orig.). 365
- Munk, Max**, Zur letzten Replik des Herrn Dr. E. Molz (Orig.). 359
- Oberstein, O.**, *Sciara nitidicollis* Meg. (Sc. frigida Wtz.?) = Larven als Schädiger junger Kulturen von *Mesembrianthemum pseudotruncatellum* Berger (Orig.). 409
- Omeliansky, W.**, Zur Frage der Zellulosegärung (Orig.). 472
- Osterwalder, A. s. Müller-Thurgau.**
- Pringsheim, Hans s. Rosenblat-Lichtenstein, Stephanie.**
- Rahn, Otto**, Methode zur Schätzung der Anzahl von Protozoen im Boden (Orig.). 419

Zweite Abt. Bd. 36.

38

- Ritter, Georg Albert**, Beiträge zur Kenntnis der niederen pflanzlichen Organismen, besonders der Bakterien, von Hoch- und Niedermoores in floristischer, morphologischer und physiologischer Beziehung (Orig.). 490
- Rosenblat-Lichtenstein, Stephanie u. Pringsheim, Hans**, Über ein aerobes Stickstoff assimilierendes Clostridium (Orig.). 468
- Růžicka, Vladislav**, Eine Methode zur Darstellung der Struktur fertiger Bakteriosporen, nebst Bemerkungen über das Reifen derselben (Orig.). 577
- Stewart, Robert**, The intensity of nitrification in acid soils (Orig.). 477
- Thaysen, A. C. s. Thöni, J.**
- Thöni, J. und Thaysen, A. C.**, Micrococcus mucofaciens n. sp., ein Milchsäurebakterium (Orig.). 359
- Tubeuf, C. v.**, Mistelinfectionen zur Klärung der Rassenfrage (Orig.). 508
- Voges, Ernst**, Über Regenerationsvorgänge nach Hagelschlagwunden an Holzgewächsen (Orig.). 532
- Wahl, Bruno**, Kleinere Mitteilungen über die Nonne und deren Feinde. (Berichtigung.) (Orig.). 531
- Werth, E.**, Zur Kenntnis des Sempervivumrostes (Orig.). 395
- Wolff, Max**, Eine neue Mikroskopierlampe (Orig.). 426
- , Über ein densimetrisches Laugenbesteck für den Gebrauch auf dem Mikroskopiertisch (Orig.). 429

II. Namen- und Sachverzeichnis.

- Abies concolor*, Infektion mit Fichtenmisteln. 524
- *pectinata*, Infektion mit Tannenmisteln. 525
- *nordmanniana*, Infektion mit Tannenmisteln. 525
- Acer s. a. Ahorn*.
- *dasycarpum*, Infektion mit Apfelmistel. 531
- Actinomyces albus*, Ausnutzung verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. 368
- —, Vorkommen im Boden. 365
- —, Wirkung von Säure und Alkali. 378
- *chromogenes*, Ausnutzung verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. 368
- —, Vorkommen im Boden. 365
- —, Wirkung von Säure und Alkali. 378
- *odorifer*, Ausnutzung verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. 368
- —, Vorkommen im Boden. 365
- —, Wirkung von Säure und Alkali. 378
- Ahorn s. a. Acer*.
- , Schwarzfleckenkrankheit, Untersuchung. 67
- Alliaria officinalis*, Schädigung durch Phyllosticta ochripes. 105
- Alyssum minimum*, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
- Ammoniakbildung im Boden, Wirkung verschiedener Salze. 382
- Apfelbaum, s. a. *Pirus malus*.
- , Schädigung durch Hagel. 532
- Apfelmistel s. Mistel, Apfel.
- Aspergillus niger*, Wirkung von schweren Metallen. 54
- Bacillus acidilactici*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *amylobacter*, Wirkung von Sauerstoff auf vegetative Keime. 14
- — — — — Sporen. 28
- *anthracis*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *botulinus*, Wirkung von Sauerstoff auf vegetative Keime. 14
- — — — — Sporen. 27
- *coli*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *enteritidis*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *faecalis alcaligenes*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *fluorescens*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *oedematis maligni*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *paratyphi*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *pneumoniae*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *rhinoscleromatis*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *saprogenes vini*, Vorkommen im Wein. 140
- *solanacearum*, Kultur, Bedeutung der Quantität des Impfmateriales. 497
- —, Variabilität. 491
- —, Wirkung der Alkalität des Nährbodens. 493
- *subtilis*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *typhi*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- — *murium*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570

- Bacillus viscosus vini*, Erreger des Zäherwerdens des Weines. 136
- Bacterium acidi viscosum* n. sp., Erreger eines Bierfehlers. 437
- *coli mutabile*, Kultur, Bedeutung der Quantität des Impfmateri als. 499
- *deliense* n. sp., Variabilität. 499
- *gracile* n. sp., Diagnose. 275
- —, Erreger des Milchsäurestiches des Weines. 307
- —, Gärtätigkeit, Wirkung der Temperatur. 218
- —, Morphologie. 202
- —, Säureabbau im Wein. 292
- —, Spaltung von Äpfelsäuren. 209
- —, — — Glukosiden. 208
- —, — verschiedener Zuckerarten. 205
- —, Wirkung auf Hefe. 223
- —, — von Alkohol und Säure. 215
- *lactis acidi*, Bedeutung für die Cheddar-käsebereitung. 447
- — —, enzymatische Untersuchung. 454
- *mannitopoeum* n. sp., Diagnose. 275
- —, Erreger des Milchsäurestiches des Weines. 307
- —, — — Mäusegeschmackes des Weines. 202, 323
- —, Gärtätigkeit, Wirkung der Temperatur. 185
- —, Morphologie. 157
- —, Säurebildung. 167
- —, Spaltung der Äpfelsäure. 176
- —, — — Glukosiden. 173
- —, — verschiedener Zuckerarten. 162
- —, Wirkung auf Hefe. 194
- —, — von Alkohol und Säure. 182
- *pyocyaneum*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- *vulgare*, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- Bakterien, anaërobe, Bewegung, Wirkung von Sauerstoff.** 22
- —, Untersuchung. 1
- —, Wirkung von Sauerstoff auf vegetative Keime. 12
- —, — — — Sporen. 25
- —, Säureabbau im Wein. 150, 288
- —, Sporenstruktur. 577
- —, Verhalten auf Neutralrotagar. 570
- —, Vorkommen im Bier. 435
- —, — in Milch. 359
- —, — im Moorboden. 490
- —, — — Wein. 131
- —, Zellulose vergärende, Vorkommen. 340
- Bakteriologische Weinuntersuchung, Bedeutung für die Beurteilung des Weines.** 327
- Betula verrucosa*, Infektion mit Apfelmistel. 531
- —, — — Eichenmistel. 513
- Bier, Fadenziehen.** 433
- —, Vorkommen von Bakterien. 435
- Birnbäum, Schädigung durch Hagel.** 532
- Birnenmistel s. Mistel, Birnen-.**
- Bitterwerden des Weines.** 142
- Boden, Ammoniakbildung, Wirkung verschiedener Salze.** 382
- —, getrockneter, Bakterientätigkeit. 348
- —, Protozoen, Zählmethode. 419
- —, Protozoengehalt beim Austrocknen. 420
- —, Trocknen. 346
- —, Vorkommen von *Actinomyces albus*. 365
- — — *Actinomyces chromogenes*. 365
- — — *Actinomyces odorifer*. 365
- Bockser des Weines.** 136
- Buche, Vorkommen von *Phyllotreta nigripes*.** 103
- Buttersäurestich des Weines.** 149
- Capsella bursa pastoris*, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
- Cardamine, Schädigung durch *Phyllotreta tetrastigma*.** 105
- Cattleya labiata, Schädigung durch *Sciara*.** 412
- Cedrus atlantica, Infektion mit Kiefern-mistel.** 522
- Champignon, Schädigung durch *Sciara frigida*.** 411
- — — *Sciara ingenua*. 411
- Cheddarkäse s. Käse, Cheddar.**
- Cheiranthus, Schädigung durch *Phyllotreta nigripes*.** 102
- Clostridium aërobium, Stickstoffbindung.** 469
- Coccus diphtheriae, Verhalten auf Neutralrotagar.** 570
- Comarosporium mesembrianthemii, Vorkommen auf *Mesembrianthemum deltoides*.** 412
- Crataegus oxyacantha, Infektion mit Apfelmistel.** 531
- Cratotechus larvarum, natürlicher Feind der Nonne.** 531
- Cucurbita pepo, Gewinnung bakterienfreier Samen.** 423
- Dematium pullulans, Erreger des schleimigen Weines.** 136
- Densimeter, neues.** 429
- Distel, Vorkommen von *Sciara praecox*.** 410
- Dsaudan.** 418
- Ei, Konservierung in China.** 418
- Eiche, Vorkommen von *Phyllotreta nigripes*.** 103
- Endophyllum sempervivi, Schädling von *Sempervivum tectorum*.** 398
- —, Sporenkeimung. 395
- Epilobium angustifolium, Schädigung durch *Haltica oleracea*.** 112
- Erbse, Gewinnung bakterienfreier Samen.** 423
- —, Schädigung durch *Sciara*. 412

- Erdflöhe, Wirtspflanzen. 108
 Esche, amerikanische, Infektion mit Eichenmistel. 513
 Eschenholz, Vorkommen von *Sciara ligniperda*. 410
 Fadenziehen des Bieres. 433
 Fichtenmistel s. Mistel, Fichten-.
Fraxinus cinerea, Infektion mit Apfelmistel. 531
 Gärung, Gase, Untersuchungsmethode. 438
 Gallen durch *Sciara* an *Santolina chamaecyparissus*. 411
 Gloxinia, Schädigung durch *Sciara*. 412
 Granakäse s. Käse, Grana.
 Gurke, Schädigung durch *Sciara*. 412
 Hagel, Beschädigung von *Rubus idaeus*. 555
 —, Schädigung an Obstbäumen. 532
Haltica oleracea, Schädling von *Epilobium angustifolium*. 112
 — — — — *Oenothera biennis*. 112
 — — — — *Polygonum aviculare*. 111
 Heerwurm s. *Sciara militaris*.
 Hefe, Säureabbau im Wein. 150
 —, Schwefelwasserstoffbildung im Wein 137
 —, Wirkung von *Bacterium gracile*. 223
 — — — — *Bacterium mannitolpoeum*. 194
 — — — — *Micrococcus acidovorax*. 263
 — — — — *Micrococcus variococcus*. 263
Hesperis, Schädigung durch *Phyllotreta nigripes*. 102
 Hexenringbildung bei Pilzen, Bedingungen. 353
 Himbeerstrauch, Schädigung durch Hagel. 532
 Hueidan. 418
 Hyazinthe, Schädigung durch *Sciara*. 412
Iberis, Schädigung durch *Phyllotreta nigripes*. 102
Iris pumila, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
 Käse, Cheddar-, Bakteriologie. 443
 —, —, Reifung. 450
 —, —, Vorkommen von Kokken. 465
 —, Grana-, Herstellung mit Reinkulturen. 42
 —, Parmesan-, Herstellung, rationelle. 42
 Kakteen, Schädigung durch *Sciara*. 412
 Kalium, Wirkung auf *Aspergillus niger*. 61
 Kartoffel, faulende, Vorkommen von *Sciara vitripennis*. 410
 Kiefernmistel s. Mistel, Kiefern-.
 Kohlerdflöhe, Untersuchung. 98
 Kürbis s. *Cucurbita pepo*.
Lactaria deliciosa, Schädigung durch *Sciara*. 411
Larix japonica, Infektion mit Kiefernmistel 522
 — — — — Tannenmisteln. 525
 Laugenbesteck, densimetrisches. 429
 Linde, Infektion mit Apfelmistel. 529
 —, — — Pappelmistel. 526
 Lindwerden des Weines. 135
 Mäuseln des Weines. 141, 202, 323
 Mais, bakteriologische Untersuchung der von den Blättern umhüllten Kolben. 424
 Mangan, Wirkung auf *Aspergillus niger*. 61
 Mannitgärung des Weines. 135. 305
Matthicola, Schädigung durch *Phyllotreta nigripes*. 102
 Meerrettich, Schädigung durch *Phyllotreta armoraciae*. 105
Melandrium album, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
Mesembrianthemum, Schädigung durch *Pulvinaria mesembrianthemii*. 412
 —, Vorkommen von *Pestalozzia palmarum*. 412
 — *aequilaterale*, Vorkommen von *Septoria confluens*. 412
 — *deltoides*, Vorkommen von *Comarosporium mesembrianthemii*. 412
 — *pseudotruncatellum*, Schädigung durch *Sciara nitidicollis*. 409
Micrococcus acidovorax n. sp., Diagnose. 278
 — — — —, Gärtätigkeit, Wirkung der Temperatur. 258
 — — — —, Milchsäurebildung. 242
 — — — —, Morphologie. 237
 — — — —, Spaltung von Apfelsäuren. 248
 — — — —, — verschiedener Zuckerarten. 241
 — — — —, Wirkung auf Hefe. 263
 — — — —, — von Alkohol und Säure. 255
 — *mucofaciens* n. sp., Vorkommen in Milch. 359
 — *saprogenes vini*, Vorkommen im Wein. 140
 — *variococcus* n. sp., Diagnose. 278
 — — — —, Gärtätigkeit, Wirkung der Temperatur. 258
 — — — —, Milchsäurebildung. 242
 — — — —, Morphologie. 237
 — — — —, Spaltung von Äpfelsäuren. 248
 — — — —, — — Glukosiden. 246
 — — — —, — verschiedener Zuckerarten. 241
 — — — —, Wirkung von Alkohol und Säure. 255
 — — — —, — auf Hefe. 263
 Mikroorganismen, Reinkultur, kontinuierliche. 573
 Mikroskopierlampe, neue, Beschreibung. 426
 Milch, Fehler. 359
 —, Reifung bei Herstellung von Grana-käse. 42

- Milch, Vorkommen von Bakterien. 359
 Milchsäurestich von Obstweinen. 133. 305
 Mistel, Apfel-, Infektion von *Acer dasycarpum*. 531
 —, —, — — *Betula verrucosa*. 531
 —, —, — — *Crataegus oxyacantha*. 531
 —, —, — — *Fraxinus cinerea*. 531
 —, —, — — *Pirus malus*. 531
 —, —, — — *Populus tremula*. 527
 —, —, — — *Quercus rubra*. 531
 —, —, — — Linde. 529
 —, —, — — *Salix caprea*. 531
 —, —, — — *Sorbus aucuparia*. 527
 —, Birnen-, Infektion von *Pirus malus*. 531
 —, —, — — *Tilia*. 531
 —, Eichen-, Infektion von amerikanischer Eiche. 513
 —, —, — — *Betula verrucosa*. 513
 —, —, — — *Quercus pedunculata*. 513
 —, —, — — *Quercus rubra*. 513
 —, —, — — *Sorbus aucuparia*. 513
 —, Fichten-, Infektion von *Abies concolor*. 524
 —, —, — — *Pinus silvestris*. 524
 —, Infektionsversuche. 508
 —, Kiefern-, Infektion von *Cedrus atlantica*. 522
 —, —, — — *Larix japonica*. 522
 —, —, — — *Picea excelsa*. 522
 —, —, — — *Pinus larici*. 522
 —, —, — — *Pinus montana*. 522
 —, —, — — *Pinus resinosa*. 522
 —, Pappel-, Infektion von Linde. 526
 —, —, — — *Populus simonii*. 526
 —, Spezialisierung. 508
 —, Tannen-, Infektion von *Abies nordmanniana*. 525
 —, —, — — *Abies pectinata*. 525
 —, —, — — *Larix japonica*. 525
 Moorboden, Vorkommen von Bakterien. 490
 Nasturtium, Schädigung durch *Phyllotreta exclamationis*. 105
 —, — — *Phyllotreta tetrastigma*. 105
 Nelke, Schädigung durch *Sciara*. 412
 Nonne, *Cratichneumon larvarum*, natürlicher Feind. 531
 Obst, Vernarbung von Hagelschlagstellen. 532
 Obstbäume, Schädigung durch Hagel. 532
 —, Vernarbung von Hagelschlagstellen. 535
 Obstwein s. Wein, Obst.
Oenothera biennis, Schädigung durch *Haltica oleracea*. 112
Paraplectrum foetidum, Wirkung von Sauerstoff auf vegetative Keime. 13
 —, —, — — Sporen. 26
 Parmesankäse s. Käse, Parmesan.
Pestalozzia palmarum, Vorkommen auf *Mesembrianthemum*. 412
 Pflanzen, Reinkultur. 421
Phaseolus multiflorus, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
 — *vulgaris*, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
Phyllotreta armoraciae, Schädling von Meerrettich. 105
 — *atra*, Wirtspflanzen. 103
 — *cruciferae*, Beschreibung. 103
 — *exclamationis*, Schädling von *Nasturtium*. 105
 — *nemorum*, Beschreibung. 104
 — *nigripes*, Schädling von *Reseda luteola*. 109
 — —, Vorkommen auf Bäumen. 103
 — —, Wirtspflanzen. 102
 — *nodicornis*, Schädling von *Reseda luteola*. 109
 — *ochripes*, Schädling von *Alliaria officinalis*. 105
 — *procera*, Schädling von *Reseda luteola*. 109
 — *tetrastigma*, Schädling von *Cardamine*. 105
 — —, — — *Nasturtium*. 105
 — *undulata*, Beschreibung. 103
 — *vittula*, Beschreibung. 104
Physalis francheti, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
Phytophthora infestans, Sporenkeimung auf verschiedenen Nährböden. 500
 Pidan. 418
Picea excelsa, Infektion mit Kiefernmistel. 522
 Pilze, Hexenringbildung, Bedingungen. 353
 —, Wirkung von schweren Metallen. 54
Pinus larici, Infektion mit Kiefernmistel. 522
 — *montana*, Infektion mit Kiefernmistel. 522
 — *resinosa*, Infektion mit Kiefernmistel. 522
 — *silvestris*, Infektion mit Fichtenmisteln. 524
Pirus malus s. a. Apfelbaum.
 — —, Infektion mit Apfelmistel. 531
 — —, — — Birnenmistel. 531
Polygonum aviculare, Schädigung durch *Haltica oleracea*. 111
Populus simonii, Infektion mit Pappelmistel. 526
 — *tremula*, Infektion mit Apfelmistel. 527
Psylliodes chrysocephala, Schädling von Raps. 107
 — *napi*, Beschreibung. 108
Pulvinaria mesembrianthemii, Schädling von *Mesembrianthemum*. 412
Quercus pedunculata, Infektion mit Eichenmistel. 513
 — *rubra*, Infektion mit Apfelmistel. 531
 — —, — — Eichenmistel. 513
 Raps, Schädigung durch *Psylliodes chrysocephala*. 107

- Reseda luteola*, Schädigung durch *Phyllotreta nigripes*. 109
 — — — *Phyllotreta nodicornis*. 109
 — — — *Phyllotreta procera*. 109
 — *odorata*, Schädigung durch *Phyllotreta nigripes*. 109
 — — — *Phyllotreta nodicornis*. 109
Rhytisma acerinum, Infektionsversuch. 72
 — — —, Spezialisierung. 72
Rosa, Schädigung durch Hagel. 532
 — — — *Soiara*. 412
Rubus idaeus, Vernarbung von Hagel-schlagstellen. 555

Salix caprea, Infektion mit Apfelmistel. 531
 Samen, Sterilisierung. 421
 — unbeschädigter Früchte, frei von Mikroorganismen. 425
Santolina chamaecyparissus, Gallenbildung durch *Soiara*. 411
 Sauerstoff, Wirkung auf anaerobe Bakterien. 12
 Schleimigwerden des Weines durch *Dematium pullulans*. 136
 Schwefelwasserstoff, Bildung durch Hefen im Wein. 137
Soiara, Bekämpfungsmittel. 416
 —, Gallenbildung an *Santolina chamaecyparissus*. 411
 —, Schädling von *Cattleya labiata*. 412
 — — — Erbse. 412
 — — — Gloxinia. 412
 — — — Gurke. 412
 — — — Hyazinthe. 412
 — — — Kakteen. 412
 — — — *Lactaria deliciosa*. 411
 — — — Nelke. 412
 — — — *Rosa*. 412
 — *frigida* s. a. *Soiara nitidicollis*.
 — —, Schädling des Champignons. 411
 — *ingenua*, Schädling des Champignons. 411
 — *ligniperda*, Vorkommen in Eschenholz. 410
 — *militaris*, Biologie. 409
 — *nitidicollis*, Schädling von *Mesembrianthemum pseudotruncatellum*. 409
 — *piri*, Parasitismus. 410
 — *praecox*, Vorkommen in Disteln. 410
 — *vitripennis*, Vorkommen in faulenden Kartoffeln. 410
Sempervivum tectorum, Schädigung durch *Endophyllum sempervivi*. 398
 — —, Wirkung von Beschattung auf die Blattbildung. 402
Septoria confluens, Vorkommen auf *Mesembrianthemum aequilaterale*. 412

Sorbus aucuparia, Infektion mit Apfelmistel. 527
 — — — Eichenmistel. 513
Spirillum bataviae n. sp., Vorkommen und Beschreibung. 41
 Sterilisierung lebender Samen. 421
 Stickstoff, Bindung durch *Clostridium aerobicum*. 469
Syringa, Schädigung durch Hagel. 532

Thlaspi arvense, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
Tilia, Infektion mit Birnenmistel. 531
 Trinkwasser s. Wasser, Trink-.
Tropaeolum, Schädigung durch *Phyllotreta nigripes*. 102

 Ulme, Vorkommen von *Phyllotreta nigripes*. 103

Viscum album, Kreuzung mit *Viscum oruciatum*. 510

 Wasser-, Trink-, Kontrolle mit Neutralrot-agar. 567
 Wein, Beurteilung, Notwendigkeit der bakteriologischen Untersuchung. 327
 —, Bitterwerden. 142
 —, Bockser. 136
 —, Buttersäurestich. 149
 —, Krankheiten. 132
 —, Lindwerden. 135
 —, Mäuseln. 141. 202. 323
 —, Mannitgärung. 135. 305
 —, Milchsäurestich durch *Bacterium gracile*. 307
 — — — *Bacterium mannitolpoeum*. 307
 —, Obst-, Milchsäurestich. 133. 305
 —, Säureabbau durch Bakterien und Hefen. 150
 — — — Bakterien. 288
 —, Schleimigwerden durch *Dematium pullulans*. 136
 —, Schwefelwasserstoffbildung durch Hefen. 137
 —, Umschlagen. 137. 324
 —, Vorkommen von Bakterien. 131
 —, Zähwerden. 135
 Wundheilung an durch Hagel verletzten Obstbäumen. 535

 Zähwerden des Weines. 135
Zea mays, Gewinnung bakterienfreier Samen. 423
 Zellulose, Gärung. 472
 —, Vergärung bei hohen Temperaturen. 339
 Zink, Wirkung auf *Aspergillus niger*. 56

III. Verzeichnis der Abbildungen.

Actinomyces, Kultur.	367	Micrococcus varioococcus n. sp., Kultur	
— albus.	380	(Taf. I. Fig. 8. Taf. II. Fig. 19. 25).	336
— chromogenea.	381	Mikroskopierlampe.	427
Actinomycceten, Kulturen (Taf. I—III).	381		
Apparat zur Untersuchung von Gärungs-		Phyllotreta armoraciae (Fig. 4).	115
gasen.	441	— atra.	120
Bacterium gracile n. sp., Kultur (Taf. I.		— flexuosa (Fig. 6).	117
Fig. 4 u. 5. Taf. II. Fig. 10. 16—18. 24).	336	— nemorum (Fig. 8).	118
— mannitopoeum n. sp., Kultur (Taf. I.		— nigripes.	121
Fig. 1—3. Taf. II. Fig. 9. 12—15. 21	336	— undulata (Fig. 9).	118
—23).	336	— —, Flügeldecke (Fig. 5. B).	115
Bakterien aus Cheddar-Käse.	461	— vittata (Fig. 7).	117
— — umgeschlagenem Rotwein (Taf. III).	336	— —, Flügeldecke (Fig. 5. A).	115
—, Sporen (Taf. I).	586	— vittula (Fig. 10).	118
Bergahorn mit Rhytisma.	73. 82. 95.	Phytophthora infestans, keimende Koni-	
— — — pseudoplatani (Taf. I. Fig. 1 u.		dien (Taf. I).	508
2. Taf. II. Fig. 3. Taf. III. Fig. 6. Taf.		Psylliodes, Hinterbein.	114. 122
IV. Fig. 2).	98.	— chrysocephala.	123
Cheddar-Käse s. Käse, Cheddar-.		— cuprea, Augenrinne (Fig. 16).	126
Endophyllum sempervivi, Sporenkeimung		— fusiformis, Augenrinne (Fig. 18).	126
(Taf. I).	408	— instabilis, Augenrinne (Fig. 17).	126
Gärungsgase, Apparat zur Untersuchung.	441	— mapi, Kopf.	124
Hagelwunden, Vernarbung.	536. 541. 542.		
546. 551. 556. 557. 560		Reinzuchtapparat.	576
Haltica oleracea.	111	Rhytisma auf Bergahorn.	73. 82
Käse, Cheddar-, normaler und durch Fäul-		— acerinum auf Spitzahorn (Taf. II.	
nisbakterien verunstalteter.	451	Fig. 3).	98
Laugenbesteck, densimetrisches.	429	— pseudoplatani, Asci (Taf. IV. Fig. 3—6).	98
Micrococcus acidovorax n. sp., Kultur		— —, Spermatien.	98
(Taf. I. Fig. 6. Taf. II. Fig. 11. 20. 26).	336	— —, Sporen (Taf. II. Fig. 4. Taf. IV.	
		Fig. 7).	98
		— — auf Bergahorn.	95
		Sciara nitidicollis, Larve und Imago.	414
		Sempervivum, gesund.	399
		—, infiziert.	398. 400
		Spirillum bataviae n. sp.	41
		Spitzahorn mit Rhytisma acerinum (Taf.	
		II. Fig. 3. Taf. III. Fig. 5. Taf. IV.	
		Fig. 1).	98

IV. Neue Literatur.

127. 350. 431. 588.

Fürstlich priv. Hofbuchdruckerei (F. Mitzlaff) Rudolstadt.

**THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW**

**AN INITIAL FINE OF 25 CENTS
WILL BE ASSESSED FOR FAILURE TO RETURN
THIS BOOK ON THE DATE DUE. THE PENALTY
WILL INCREASE TO 50 CENTS ON THE FOURTH
DAY AND TO \$1.00 ON THE SEVENTH DAY
OVERDUE.**

JUN 9 1955

Book Slip-10m-8,'51(6813s4)458

81921		QR1
Zen. f. bakt.		Z4
		Abt.2
JUN 10 '36		v.36

Zen.

QR1

Z4

Abt.2

v.36

81921



Original from
UNIVERSITY OF CALIFORNIA

